



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Asociación del perfil de expresión de citocinas
inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 en
pacientes con el desarrollo de la enfermedad**

T E S I S

Que para obtener el Título de
Licenciada en Bioquímica Diagnostica

P R E S E N T A:

Fanny Romero Piña

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. Juan Carlos Bravata Alcántara

ASESOR:

Dra. Maritere Domínguez Rojas



**UNAM
CUAUTITLÁN**

Cuautilán Izcalli, Estado de México, 2022



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Asociación del perfil de expresión de citocinas inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 en pacientes con el desarrollo de la enfermedad

Que presenta la pasante: **Fanny Romero Piña**

Con número de cuenta: **313159835** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Asociación del perfil de expresión de citocinas inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 en pacientes con el desarrollo de la enfermedad

Que presenta la pasante: **Fanny Romero Piña**

Con número de cuenta: **313159835** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	_____
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Asociación del perfil de expresión de citocinas inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 en pacientes con el desarrollo de la enfermedad

Que presenta la pasante: **Fanny Romero Piña**

Con número de cuenta: **313159835** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Asociación del perfil de expresión de citocinas inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 en pacientes con el desarrollo de la enfermedad

Que presenta la pasante: **Fanny Romero Piña**

Con número de cuenta: **313159835** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

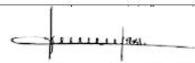
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Asociación del perfil de expresión de citocinas inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 en pacientes con el desarrollo de la enfermedad

Que presenta la pasante: **Fanny Romero Piña**

Con número de cuenta: **313159835** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de noviembre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	_____
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	_____
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López Cabrera	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg

Agradecimientos

Por el esfuerzo, dedicación, paciencia, por su confianza y por todo lo que me ha dado a lo largo de mi formación, me gustaría agradecerle M. en C. Juan Carlos Bravata Alcántara, sólo usted sabe todo lo que a lo largo de este proyecto hemos vivido, agradeceré siempre su guía y sus consejos. No hay palabras que sean suficientes para describir lo grandiosa que fue la experiencia de trabajar a su lado.

A usted Maestra Iliana Cortez Ortiz quien desde el primer momento me brindó su cariño, amistad, su bondad, y fue mi gran apoyo en muchos momentos, podría decir que mi cómplice, muchas gracias por todo.

A usted Dra. Sonia Chávez, por su apoyo incondicional, por demostrarme lo fuerte que puedo ser, por siempre confiar en mi trabajo y en mis capacidades, usted es un verdadero ejemplo de lo que una mujer puede llegar a ser.

A la Dra. Minerva por todos los consejos y por su gran apoyo en la elaboración de este trabajo, por las herramientas brindadas, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio por su apoyo, sus enseñanzas y todos los momentos divertidos que sin ustedes no hubieran sido igual, gracias por creer en mí y en darme la oportunidad de aprender y enseñar con ustedes.

Finalmente, mis padres quienes son mi motor y mi mayor inspiración, que, a través de su amor, paciencia, buenos valores, ayudan a trazar mi camino, gracias por confiar en mí y por su apoyo incondicional, a pesar de las adversidades e inconvenientes que se presentaron. A mis hermanos que son mi motivo para salir adelante, gracias por las risas y los buenos momentos.

Y por supuesto a mi querida Universidad Nacional Autónoma de México y a todas las autoridades, por permitirme concluir con una etapa de mi vida, gracias por la paciencia, orientación y guiarme en el desarrollo de esta investigación.

Dedicatoria

Para todas las personas que no se rindieron...

*"No te rindas, por favor no cedas, aunque el frío queme, aunque el miedo muerda, aunque el sol se esconda, y se calle el viento, aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños. Porque la vida es tuya y tuyo también el deseo, porque cada día es un comienzo nuevo, porque esta es la hora y el mejor momento". **Mario Benedetti***

*"Los retos de la vida no están ahí para paralizarte, sino para ayudarte a descubrir quién eres". **Bernice Johnson Reagon***

*"Si el fuego de tu corazón es lo bastante fuerte, quemará los obstáculos que aparezcan en tu camino". **Suzy Kassem***

ÍNDICE

<i>Agradecimientos</i>	vii
<i>Dedicatoria</i>	viii
Índice de tablas.....	xii
Índice de Abreviaturas.....	xiv
Índice de figuras.....	xv
Índice de graficas.....	xvi
I. RESUMEN	17
II. INTRODUCCIÓN	18
III. MARCO TEÓRICO	19
3.1. Antecedentes.....	19
3.2. Sistema inmunológico y sistema respiratorio contra los virus.....	21
3.3. SARS-CoV-2.....	24
3.4. Mecanismo de trasmisión.....	25
3.5. Replicación del SARS-CoV-2.....	26
3.6. COVID-19.....	28
3.7. COVID-19 Leve-Moderado.....	29
3.8. COVID-19 Grave.....	30
3.9. COVID-19 critico.....	30
3.10. Manifestaciones clínicas.....	32
3.11. Factores de Riesgo.....	35
3.12. Carga Viral.....	36
3.13. Tormenta de citocinas.....	39
3.13.1. Ferritina.....	43
3.13.2. Proteína C Reactiva (PCR).....	44
3.13.3. Interleucina 1 (IL-1).....	45
3.13.4. Interleucina 6 (IL-6).....	46
3.13.5. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).....	47
3.14. Diagnóstico.....	49
3.15. Tratamiento.....	50
3.16. Epidemiología.....	51
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	53

V. JUSTIFICACIÓN	53
VI. HIPÓTESIS	54
VII. OBJETIVOS	54
Objetivos particulares.....	54
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	54
8.1. Tipo de estudio.....	54
8.2. Población de estudio.....	54
8.3. Criterios de inclusión.....	55
8.4. Criterios de exclusión.....	55
8.5. Criterios de eliminación.....	55
8.6. Criterios de Selección del Grupo Control.....	55
8.7. Material biológico.....	56
8.8. Reactivos.....	57
8.9. Equipos.....	57
8.10. Métodos.....	58
8.10.1. Diagrama de flujo.....	58
8.10.2. Diseño y validación de cebadores.....	58
8.10.3. Extracción de ARN en muestras respiratorias.....	59
8.10.4. Obtención de ARN de leucocitos en sangre periférica.....	60
8.10.5. Detección de SARS-COV-2.....	61
8.10.6. Cuantificación absoluta: Carga Viral.....	61
8.10.7. Construcción del Plásmido del Gen E.....	62
8.10.8. Condiciones de PCR en tiempo real para la Cuantificación de la Carga Viral.....	63
8.10.9. Estandarización: Curva de calibración.....	64
8.10.10. Cuantificación relativa: Expresión de citocinas.....	65
8.10.11. Grupo Control.....	66
8.10.12. Condiciones para la preparación de cDNA.....	66
8.10.13. Condiciones de PCR en tiempo real para la Cuantificación Relativa.....	67
8.10.14. Normalización con el gen GAPDH.....	68
8.10.15. Expresión de citocinas inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF α	70
8.11. Análisis estadístico.....	70
IX. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	71
Características demográficas de los pacientes con COVID-19.....	74

Clasificación de los pacientes con COVID-19	77
Evolución de los pacientes con COVID-19	78
Hallazgos tomográficos en pacientes con COVID-19 (CO-RADS)	80
Requerimiento de Ventilación Mecánica en pacientes con COVID-19	81
Características clínicas de los pacientes con COVID-19.....	82
Parámetros sanguíneos en pacientes con COVID-19	83
Comorbilidades en pacientes con COVID-19.....	88
Relación entre la Carga Viral y Expresión de Citocinas en COVID-19	91
Expresión de citocinas en Grupo Control	94
GRUPO COVID-19 LEVE-MODERADO	100
GRUPO COVID-19 GRAVE	102
GRUPO COVID-19 CRITICO	105
X. CONCLUSIONES	110
REFERENCIAS	111
ANEXO 1	120
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	120

Índice de tablas

Tabla 1. Características físicas y clínicas de los pacientes sanos (Donadores de sangre, de acuerdo al Instituto Mexicano del Seguro Social, 2019 y al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología, 2021).....	56
Tabla 2. Cebadores diseñados en dirección 5´-3´.....	59
Tabla 3. Cantidades de reactivos utilizados para PCR de tiempo real de las muestras de ARN de exudado nasofaríngeo.	63
Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizados para PCR de tiempo real de la curva estándar.....	64
Tabla 5. Condiciones de PCR en tiempo real para el gen E y la curva estándar (Protocolo de Berlín modificado).	64
Tabla 6. Cantidades de reactivos utilizados para síntesis de cDNA a partir de las muestras de ARN de leucocitos de sangre periférica.	66
Tabla 7. Condiciones de termociclador de punto final para síntesis de cDNA.	67
Tabla 8. Cantidades de reactivos utilizados para síntesis de cDNA a partir de las muestras de ARN de leucocitos de sangre periférica.	67
Tabla 9. Condiciones de PCR en tiempo real para la cuantificación relativa de las citocinas	67
Tabla 10. Características de los Oligonucleótidos analizados.	73
Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad.....	78
Tabla 12. Hallazgos tomográficos en pacientes con COVID-19 clasificados de acuerdo a la Escala CO-RADS de Elizalde, <i>et al.</i> 2020.....	81
Tabla 13. Signos y síntomas más frecuentes en los pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad.....	83
Tabla 14. Valores reportados en los parámetros sanguíneos que se ven más frecuentemente alterados en los pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad en la toma 2.....	84

Tabla 15. Alteraciones en los parámetros sanguíneos más frecuentes en los pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad en la toma 2	88
Tabla 16. Resultados de la carga viral por medio de cuantificación absoluta de los pacientes con COVID-19.....	92
Tabla 17. Expresión relativa del Gen IL-1 β en el grupo de pacientes sanos (Control) por el método del 2- $\Delta\Delta$ Ct.....	94
Tabla 18. Expresión relativa del Gen TNF- α en el grupo de pacientes sanos (Control) por el método del 2- $\Delta\Delta$ Ct.....	94
Tabla 19. Expresión relativa del Gen IL-6 en el grupo de pacientes sanos (Control) por el método del 2- $\Delta\Delta$ Ct.....	95
Tabla 20. Expresión relativa de las citocinas proinflamatorias de los grupos de pacientes con COVID-19 en la toma 1 y toma 2 por el método del 2- $\Delta\Delta$ Ct. (SE= Sin expresión).....	96
Tabla 21. Expresión de citocinas proinflamatorias (promedio de la expresión de cada paciente por grupo de gravedad) y promedio de carga viral en los grupos con COVID-19.....	97
Tabla 22. Resultados de carga viral y expresión de citocinas proinflamatorias de cada paciente tanto de la toma 1 como de la toma 2.	99

Índice de Abreviaturas

SARS-CoV-2	Síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2
COVID-19	Enfermedad por coronavirus 2019
ACE-2	Enzima convertidora de angiotensina-II
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
TNF-α	Factor de Necrosis tumoral alfa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
CV	Carga Viral
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
Ct	Umbral del ciclo
PaO₂/FiO₂	Cociente que mide indirectamente la lesión pulmonar.
MERS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio
VSG	Velocidad de sedimentación globular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR	Proteína C reactiva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
UCI	Unidad de cuidados intensivos
SDRA	Síndrome de dificultad respiratoria aguda
TAC	Tomografía axial computarizada
EDTA	Ácido etilendiamina tetracético (anticoagulante)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ER	Expresión Relativa
SE	Sin Expresión
T1	Toma 1
T2	Toma 2
SD	Sin dato

Índice de figuras

Figura. 1 Composición de ARN genómico de SARS-CoV-2.....	27
Figura. 2 Replicación virus SARS-CoV-2. Cevik, <i>et al.</i> , 2020. Modificado febrero, 2021.....	27
Figura. 3 Nivel de sospecha por puntaje CO-RADS según los hallazgos tomográficos.....	33
Figura. 4 Etapas de la enfermedad COVID-19. (Leonard, 2020).....	35
Figura. 5 Dinámica de la reducción de la carga viral en diferentes grados del desarrollo de la enfermedad (COVID-19).....	38
Figura. 6 Mecanismos hipotéticos subyacentes a la tormenta de citocinas inducida por SARS-CoV-2 en pulmones infectados.	42
Figura. 7 A y B Diluciones realizadas para la obtención de la curva estándar a partir del plásmido diseñado del Gen E.	65
Figura. 8 GAPDH en muestras de pacientes con COVID-19 Toma 1 por PCR en tiempo real .69	
Figura. 9 GAPDH en muestras de pacientes con COVID-19 Toma 2 por PCR en tiempo real .69	
Figura. 10 Curva de calibración por triplicado	92

Índice de graficas

Gráfico 1. Regresión lineal.....	63
Gráfico 2. Expresión relativa del Gen GAPDH en el grupo control de pacientes sanos y en los grupos de pacientes con COVID-19.....	70
Gráfico 3. Rango de edades de los pacientes con COVID-19.....	74
Gráfico 4. Edad promedio de cada grupo de estudio con diferente grado de gravedad de la enfermedad COVID-19.	75
Gráfico 5. Sexo en relación con la gravedad de la enfermedad. Grupo Leve-moderado y Ggrave.....	76
Gráfico 6. Sexo en relación con la gravedad de la enfermedad. Grupo COVID-19 crítico	76
Gráfico 7. Clasificación de los pacientes con COVID-19 en función de la gravedad.	77
Gráfico 8. Evolución de los pacientes con COVID-19.....	79
Gráfico 9. Defunciones en función del sexo en los pacientes con COVID-19 crítico.....	80
Gráfico 10. Requerimiento de ventilación mecánica en pacientes con COVID-19.....	82
Gráfico 11. Signos y síntomas más frecuentes en los pacientes con COVID-19.....	82
Gráfico 12. Comorbilidades más frecuentes en pacientes con COVID-19.....	89
Gráfico 13. Comorbilidades más frecuentes en pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad.....	90
Gráfico 14. Expresión relativa del gen IL-1 β en la toma 1 vs la toma dos en los grupos de pacientes con COVID-19 con diferentes grados de gravedad y en el grupo de pacientes sanos (control).....	98
Gráfico 15. Expresión relativa del gen IL-6 en la toma 1 vs la toma dos en los grupos de pacientes con COVID-19 con diferentes grados de gravedad y en el grupo de pacientes sanos (control).....	98
Gráfico 16. Expresión relativa del gen TNF- α en la toma 1 vs la toma dos en los grupos de pacientes con COVID-19 con diferentes grados de gravedad y en el grupo de pacientes sanos (control).....	99
Gráfico 17. Comportamiento de la Carga viral en pacientes con COVID-19 Leve-moderado. .	101
Gráfico 18. Comportamiento de la Carga viral en pacientes con COVID-19 Grave.	103
Gráfico 19. Comportamiento de la Carga viral en pacientes con COVID-19 Critico.....	106
Gráfico 20. Expresión relativa de las citocinas proinflamatorias.	109

I. RESUMEN

En este trabajo se estudió la relación entre la tormenta de citocinas y la carga viral con la gravedad de la enfermedad COVID-19 y la evolución clínica en 22 pacientes positivos a SARS-CoV-2. De acuerdo con las características clínicas de cada paciente se clasificaron en 3 grupos de estudio: leves-moderados (4), graves (8) y críticos (10). Las comorbilidades más frecuentes fueron la diabetes y la hipertensión y con menos frecuencia la obesidad. Se realizó el seguimiento de cada paciente desde el día de ingreso hasta el día de egreso o fallecimiento, dicho seguimiento consto en dos tomas realizadas, en promedio, a los 7 y a los 12 días después del inicio de síntomas, con un promedio entre tomas de 5 días, cada toma consto de exudado nasofaríngeo o expectoración y sangre periférica. Las alteraciones hematológicas como neutrofilia, trombocitopenia y linfopenia fueron más frecuentes en los grupos grave y critico al igual que la elevación de marcadores como ferritina, proteína C reactiva y velocidad de sedimentación globular. De acuerdo a los hallazgos tomográficos y al resultado de PCR, todos los pacientes tenían un valor de 6 en la escala de CO-RADS con hallazgos típicos de COVID-19, el 68.18% (15/22) de los pacientes requirió el uso de ventilador mecánico. La carga viral se determinó por medio de cuantificación absoluta por qPCR y se observó una disminución significativa ($p=0.02$) de la carga viral en el grupo COVID-19 leve-moderado, en el grupo COVID-19 grave hubo una ligera disminución de la carga viral pero no fue significativa ($p=0.55$) y en el grupo COVID-19 critico hubo un aumento en la carga viral, sin embargo, no fue significativo ($p=0.38$). Se realizó la comparación de la expresión de las citocinas proinflamatorias con un grupo control de pacientes sanos, sin embargo, ninguno de los genes tuvo una diferencia significativa de cada toma en comparación con dicho control: IL-1 β ($p=0.18$ y $p=0.21$), IL-6 ($p=0.10$ y $p=0.06$) y TNF- α ($p=0.43$ y $p=0.18$) ni se observó una diferencia significativa ($p=0.22$) entre la toma 1 y la toma 2, al no encontrar una sobreexpresión significativa de las citocinas proinflamatorias en los pacientes críticos se determinó que no padecieron la tormenta de citocinas y que su fallecimiento se debió a otros factores que deben estudiarse más a detalle. No se encontró una asociación entre la carga viral y la expresión de las citocinas inflamatorias con la gravedad de la enfermedad COVID-19.

II. INTRODUCCIÓN

El virus SARS-CoV-2 es un agente zoonótico emergente que apareció a finales del 2019 en Wuhan, China y que se ha convertido en una amenaza a la salud a nivel mundial debido a que se transmite fácilmente directa o indirectamente de una persona a otra. Debido al brote, la OMS (2020) designó al virus SARS-CoV-2 como la sexta emergencia de salud pública internacional el 30 de enero del 2020, y el 11 de febrero de 2020 nombró la enfermedad causada por el nuevo coronavirus como Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) declarándolo pandemia el 11 de marzo de 2020 con casos confirmados en más de 205 países.

SARS-CoV-2 produce síntomas similares a los de la gripe, entre los que se incluyen fiebre, tos, disnea, mialgia y fatiga. También se ha observado la pérdida súbita del olfato y el gusto (sin que la mucosidad fuese la causa). En casos graves se caracteriza por producir neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda, sepsis y choque séptico que conduce a alrededor del 5 % de los infectados a la muerte (Pérez *et al.* 2020). COVID-19 está asociada a una alta morbimortalidad en los pacientes de la tercera edad y/o con presencia de enfermedades crónicas. Se presenta en la mayoría de los casos con un cuadro clínico correspondiente a una infección respiratoria alta autolimitada; sin embargo, en grupos de riesgo presenta una rápida progresión a una neumonía grave y fallo multiorgánico, generalmente fatal (Pérez *et al.* 2020).

Una de las incógnitas que presenta la COVID-19 es la diferencia en el grado de afectación que presentan algunos pacientes. Probablemente, para explicar esa diferencia, hay muchos factores implicados y todos ellos están abiertos al debate que genera la reciente explosión de investigaciones sobre COVID-19 en los últimos meses. Desde polimorfismos en el receptor del virus ACE-2, la mayor susceptibilidad que suponen algunas patologías previas o la importancia de la dosis o carga viral con la que se infecta el individuo. No obstante, una de las teorías que toma un gran interés, probablemente por sus implicaciones terapéuticas, es la de un mecanismo de respuesta inmunitaria excesiva, una hiper inflamación conocida como tormenta de citoquinas. (De Francisco & Pérez, 2020)

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Antecedentes

En el mes de diciembre de 2019, un nuevo virus perteneciente a la familia de los coronavirus irrumpió como agente patógeno en la región de Wuhan en China, provocando un síndrome respiratorio agudo severo (SARS) de alta letalidad (Serrano, *et al.*, 2020), con una tasa general de muertes por número de casos diagnosticados del 6.87% (Abduljalil, *et al.*, 2020). Chen et al. presentaron un estudio en el que demuestran que la infección por SARS-CoV-2 severa se asocia con linfopenia a expensas de caídas de linfocitos T CD4+ y CD8+ pero no de linfocitos B, hiperproducción de citoquinas IL-6, IL-2R (receptor soluble de la IL2), IL-10, TNF- α y CCL-2 y descenso en la expresión de IFN- γ en linfocitos T CD4+. Los niveles de IL-6, IL-2R, IL-10 y TNF- α suben discretamente o permanecen en rango normal en casos moderados pero muy elevados en casos severos. Este estudio parece apuntar que la tormenta de citoquinas se asocia con la enfermedad COVID-19 severa (Chen, *et al.*, 2020).

Los primeros indicios de que los casos graves de COVID-19 que incluyeron una tormenta de citocinas salieron de hospitales chinos cerca del epicentro del brote. Los médicos en Wuhan, en un estudio de 29 pacientes, informaron que se encontraron niveles más altos de las citocinas IL-2R e IL-6 en infecciones de COVID-19 más graves. La IL-6 también fue un indicador temprano de una condición similar a una tormenta de citocinas en un análisis de 11 pacientes realizado por médicos en Cantón (Amber, 2020).

Otro equipo, que analizó 150 casos en Wuhan, descubrió que una variedad de indicadores moleculares para una tormenta de citocinas, incluidos IL-6, proteína C reactiva (PCR) y ferritina, eran más altos en los que murieron que en los que sobrevivieron. Y los inmunólogos en Hefei, en el este de China, informaron resultados similares entre los pacientes que murieron, así como altos niveles de células inmunes activas y dañinas que arrojan citocinas peligrosas en la sangre de pacientes con COVID-19 que requirieron cuidados intensivos. (Amber, 2020)

El concepto de “tormenta de citocinas” se deriva de la observación de que los pacientes con COVID-19 que requirieron ingreso en la unidad de cuidados intensivos presentaron concentraciones circulantes elevadas de CXCL-10, CCL-2 y TNF- α en comparación con aquellos en los que la infección fue leve o moderada (Coperchini, *et al.*, 2020). Además, se han detectado niveles elevados de IL-1, IFN- γ y IP-10 en pacientes con COVID-19. Estas citocinas inflamatorias pueden estimular la activación de las células T auxiliares tipo 1 (Th1). La respuesta Th1 es un evento crucial en la respuesta del sistema inmunológico. Los individuos afectados por COVID-19 también mostraron niveles más altos de citocinas secretadas por células Th2 (es decir, IL-4 e IL-10), que inhiben la respuesta inflamatoria. Los niveles séricos de estas citocinas en pacientes con COVID-19 están relacionados con una mayor gravedad de la enfermedad (Huang, *et al.*, 2020).

Otra casusa de la severidad de algunos casos de pacientes con COVID-19 que se ha estado estudiando es la carga viral en el momento de la exposición al virus. Estudios llevados a cabo en China han determinado que quienes cuidan de pacientes con COVID-19 son más susceptibles que otros porque, probablemente, están expuestos al virus todos los días, durante sus horas de trabajo (Plitt, 2020).

Zou, Ruan, Huang, *et al.* (2020) monitorearon las cargas virales del SARS-CoV-2 en muestras de vías respiratorias superiores, se analizó la carga viral en frotis nasales y faríngeos obtenidos de los 17 pacientes sintomáticos en relación al día de inicio de cualquier síntoma. Se detectaron cargas virales más altas (inversamente relacionadas con el valor de Ct) poco después de la aparición de los síntomas, con cargas virales más altas detectadas en la nariz que en la garganta. Se detectó la carga viral en un paciente asintomático y se determinó que fue similar a la de los pacientes sintomáticos, lo que sugiere el alto potencial de transmisión de pacientes asintomáticos o mínimamente sintomáticos al inicio de la enfermedad. Estos hallazgos concuerdan con los informes de que la transmisión puede ocurrir temprano en el curso de la infección además se sugiere que una persona puede tener una gran carga viral (dependiendo de la etapa de la infección en la que se encuentre) y no estar severamente enfermo o siquiera tener síntomas.

Además, se ha podido demostrar la ausencia de virus infectivo con cargas virales por debajo de 105 copias por muestra. Esto parece indicar que, en personas con síntomas leves, más allá de la primera semana tras el inicio de síntomas, la probabilidad de transmitir la infección a otros sería muy baja, incluso cuando el virus aún es detectable mediante PCR (Wölfel, 2020). En personas con un curso clínico más grave la carga viral es de hasta 60 veces mayor que las que tienen un curso más leve y, además, la excreción viral puede ser más duradera. (Liu, 2020)

Hoy en día, el tratamiento con antivirales tiene una efectividad limitada. El virus muta y por ende cambia rápidamente sus antígenos inmunogénicos debido a deriva genética (mutaciones puntuales en los genes de los antígenos) y por cambio antigénico (cambios de un gen completo entre distintas variantes de un virus) lo que le llevan al escape inmunológico.

3.2. Sistema inmunológico y sistema respiratorio contra los virus

El tracto respiratorio es la ruta más común de entrada viral, consecuencia de la superficie mucosa expuesta y la tasa de ventilación en reposo de 6 litros de aire por minuto. La enorme área de absorción del pulmón humano (140 metros cuadrados) también juega un papel. Cada minuto se introducen en el tracto respiratorio un gran número de partículas extrañas y gotitas en aerosol, que a menudo contienen viriones. La razón por la que no nos infectamos con más frecuencia es que existen numerosos mecanismos de defensa para proteger el tracto respiratorio. Abundan las barreras mecánicas; por ejemplo, el tracto está revestido con una capa mucociliar que comprende células ciliadas, células caliciformes secretoras de moco y glándulas subepiteliales secretoras de moco (Racaniello, 2009). Las partículas extrañas que ingresan a la cavidad nasal o al tracto respiratorio superior quedan atrapadas en el moco y se transportan a la parte posterior de la garganta donde se tragan. Si las partículas alcanzan el tracto respiratorio inferior, también pueden quedar atrapadas en el moco, que luego se eleva y sale de los pulmones por acción ciliar. Los tramos más bajos del tracto respiratorio, los alveolos, carecen de cilios. Sin embargo, estos sacos de intercambio de gases están dotados de macrófagos, cuya función es ingerir y destruir partículas. (Racaniello, 2009)

Los virus pueden ingresar al tracto respiratorio, como ya se mencionó, en gotitas en aerosol producidas al toser, estornudar o simplemente hablar, cantar o respirar. La infección también puede transmitirse por contacto con saliva u otras secreciones respiratorias de un individuo infectado. Las gotas de aerosol más grandes aterrizan en la nariz, mientras que las más pequeñas pueden aventurarse más profundamente en el tracto respiratorio, incluso hasta el alveolo (Flores, 2020). Para que un virus establezca con éxito una infección en el tracto respiratorio, debe evitar ser arrastrado por el moco o engullido por los macrófagos alveolares. Luego están los mecanismos inmunes más específicos que pueden intervenir. Baste decir que, si un virus establece una infección en el tracto respiratorio, ha superado una serie de barreras formidables que aseguran que no estemos continuamente infectados. (Racaniello, 2009)

Cuando el virus llega a los pulmones comienza a afectar el epitelio de los alveolos, que es una parte de la pared alveolar, que, al ser dañada, empieza a llenar de agua los alveolos, impidiendo el ingreso adecuado de oxígeno y de la salida del dióxido de carbono. Es aquí cuando el paciente nota la dificultad para respirar. (Flores, 2020). Donde se produce el intercambio gaseoso, inician los fenómenos inflamatorios y hasta hemorrágicos, llevando a una condición crítica. Mientras esto ocurre, en los pulmones comienzan a aparecer manchas en forma de nube que se distribuyen de forma difusa y que crecen hasta ocupar el campo pulmonar. Si el pulmón queda totalmente blanco, el paciente requiere de ventilación mecánica para poder respirar. (Flores, 2020)

Uno de los mecanismos más sofisticados de defensa del organismo es el sistema inmunológico, el cual no solo se encarga de eliminar a aquellos agentes extraños que buscan ingresar al organismo, sino que a partir de ellos genera anticuerpos para evitar volver a enfermarnos. Cuando un virus ingresa, este puede ser depurado por una primera línea de defensa gracias a los macrófagos, células responsables de ubicar, engullir y destruir el patógeno. En esta primera etapa se encuentran aquellos pacientes que no desarrollan síntomas (asintomáticos) o síntomas leves. En estos casos, las personas logran recuperarse en los primeros días del contagio. (Flores, 2020)

Cuando los macrófagos no logran destruir al virus se activa un segundo grupo de células que sirven de enlace entre esta primera línea de defensa y la siguiente: las células dendríticas, las cuales son macrófagos inactivos que buscan destruir también al intruso. En caso esto tampoco llegara a funcionar, empieza a activarse la artillería inmunológica. Lo que debería ser un ataque simple para eliminar el virus, termina por desencadenar una respuesta más sistémica. El cuerpo empieza a detectar que hay un agente agresor en el pulmón y empieza a enviar toda su batería inmunológica hacia esa zona. (Flores, 2020)

En esta segunda línea defensiva se hacen presentes ciertos mediadores llamados interleucinas, un grupo de citocinas inflamatorias que liberan una fuerte reacción inmunológica defensiva, denominada “tormenta de citocinas”. Esta gran inflamación que inicia el sistema inmunológico buscar destruir al virus. Sin embargo, el nivel inflamatorio es tan alto que incluso puede llegar a dañar al órgano mismo. La aparición de la fiebre no siempre se debe al virus, sino que también puede ser una respuesta inflamatoria secundaria a la enfermedad. Para producir fiebre, el cuerpo tiene que empezar a producir las mismas interleucinas que se manifiestan cuando hay una infección, y generan una formación de otros mediadores que viajan al hipotálamo y alteran el termostato natural del cuerpo (Flores, 2020)

Toda esta acción para combatir al virus, lleva a que se produzcan casos de neumonía severa que llevan al paciente a un peor cuadro clínico que cuando es trasladado a la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Los especialistas coinciden en que la respuesta del organismo para librarse del virus puede causar una gran acción sobre los órganos generando un “daño colateral”, es decir, incluso nuestro propio cuerpo puede provocar un mayor daño a nosotros mismos (Flores, 2020).

Los pacientes con males preexistentes, como hipertensión, diabetes y/u obesidad, se encuentran en una situación mucho más riesgosa debido a que las enfermedades crónicas que padecen ya generan una inflamación crónica, en bajas dosis, y su sistema de defensa ya está desgastado, y aunado a la infección por SARS-Cov-2 esto puede tener como consecuencia la muerte del paciente.

3.3. SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 es un β -coronavirus envuelto, de tipo ARN de cadena positiva, monocatenaria, con una secuencia genética muy similar al SARS-CoV-1 (80%) y al coronavirus de murciélago RaTG13 (96,2%). La envoltura viral está recubierta por glicoproteína pico (S), proteínas de la envoltura (E) y de la membrana (M). La unión y la entrada de la célula huésped están mediadas por la proteína S. El primer paso en la infección es la unión del virus a una célula huésped a través de su receptor objetivo. La subunidad S1 de la proteína S contiene el dominio de unión al receptor que se une al dominio de peptidasa de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE 2). En el SARS-CoV-2, la subunidad S2 está muy conservada y se considera un posible objetivo antiviral. (Cevik, *et al.*, 2020).

El SARS-CoV-2, además de los pulmones, también puede infectar otros órganos y tipos celulares durante el curso de la enfermedad, incluyendo las células mucosas del intestino, las células tubulares del riñón, células del sistema linfóide y retículo endotelial y también las células del sistema nervioso. (Serrano, *et al.*, 2020). Esto debido, en parte, a que el receptor ACE-2 se expresa también en células epiteliales del intestino, riñón, corazón y vasos sanguíneos (Sánchez, *et al.*, 2020). Infecta y se replica de forma eficiente en los neumocitos, macrófagos y células dendríticas de las partes más profundas del parénquima pulmonar en las que reside el receptor celular ACE-2 que es utilizado por este virus para unirse a estas células e iniciar el proceso infeccioso (J. Reina, 2020).

El período de incubación del SARS-CoV-2 es de 2 y hasta 11 días, de acuerdo a los reportes de diferentes países se recomienda considerar un período de incubación hasta de 15.5 días; la aparición de síntomas, en promedio, es después de 5 días, y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud hasta de 14 días después, de ahí que la recomendación de aislamiento o cuarentena abarque mínimo 14 días, algunos países han recomendado hasta 21 días de cuarentena con monitoreo de presencia del virus en pruebas serológicas. (Sánchez, *et al.*, 2020)

3.4. Mecanismo de transmisión

Como principales rutas de transmisión del SARS-CoV-2 de humano a humano está la nosocomial, y entre miembros de la familia o durante contacto cercano de personas (dentro de 1 a 2 m) así como a través de gotas respiratorias producido por una persona infectada cuando tose o estornuda (dentro de un rango de aproximadamente 2 m) (Zheng, 2020). El virus se transmite a través del contacto con gotas de una persona infectada, aunque se han hecho observaciones de la posibilidad de transmisión por vía aérea por lo que debe tenerse consideración especial cuando se generan aerosoles y la conjuntiva está expuesta, ya que el riesgo de transmisión es mayor (Sánchez, *et al.*, 2020), se ha visto que puede permanecer en forma de aerosoles cerca de 3 hrs y en las superficies (cartón, plástico) hasta 72 hrs (van, *et al.*, 2020)

El SARS-CoV-2 se aisló por primera vez de una muestra de lavado broncoalveolar y también se detectó ARN del virus en frotis nasofaríngeos y faríngeos, así como en sangre, heces, orina y saliva. (Park, 2020). Lo que se sabe sobre la transmisión (basado en estudios de rastreo de contactos) es que la capacidad de transmisión es máxima en la primera semana de la enfermedad, y no se ha documentado la transmisión después de este período (Cevik, *et al.*, 2020), de acuerdo a la OMS (2021) el periodo de excreción de viriones infecciosos en pacientes sintomáticos es de unos 5-6 días a partir de la aparición de cualquier síntoma.

Los pacientes gravemente enfermos o inmunodeprimidos pueden tener una diseminación del virus relativamente prolongada y algunos pacientes pueden tener una diseminación intermitente de ARN; sin embargo, los resultados de niveles bajos cercanos al límite de detección pueden no constituir partículas virales infecciosas. (Cevik, *et al.*, 2020). Si bien las personas asintomáticas (aquellas que no presentan síntomas durante la infección) pueden transmitir la infección, su grado relativo de contagiosidad parece ser limitado.

Las personas con síntomas leves y aquellas cuyos síntomas aún no han aparecido todavía portan grandes cantidades de virus en el tracto respiratorio superior, que podría contribuir a la fácil y rápida propagación del SARS-CoV-2. Es probable que la

transmisión sintomática y presintomática (uno o dos días antes del inicio de los síntomas) desempeñe un papel más importante en la propagación del SARS-CoV-2. Sigue siendo necesaria una combinación de medidas preventivas, como el distanciamiento físico y las pruebas, la localización y el autoaislamiento. (Cevik, *et al.*, 2020). Durante el período de incubación (tiempo transcurrido entre la exposición y los síntomas de aparición en un organismo patógeno), el organismo puede multiplicarse y alcanzar un límite umbral necesario producir síntomas en el hospedero (Rodríguez, *et al.*, 2020).

3.5. Replicación del SARS-CoV-2

Existen cuatro proteínas estructurales que son esenciales para que el virus se replique, se ensamble e infecte al huésped: la proteína S (espiga) es, como ya se mencionó, la encargada de la unión a las células del huésped, este homotrímero tiene proyecciones extracelulares que le dan al virus la apariencia de una corona de picos. La proteína M (membrana) se conforma de tres dominios transmembrana que le dan la forma circular a la partícula viral y se une hacia el interior a la nucleocápside. La proteína E (envoltura) permite el ensamblaje y la liberación extracelular del virus. La proteína N (nucleocápside) está conformada por dos dominios que se une al ARN, se une a la proteína nsp3, para empaquetar el genoma del virus, además de ser antagonista del IFN (interferón) (Sánchez, *et al.*, 2020).

Casi dos terceras partes del ARN genómico del virus se utiliza como un molde o plantilla para la traducción directa de una poliproteína 1a/1ab (pp 1a/1ab) que se encarga de la codificación de proteínas no estructurales (nsp, de las que se conocen 16, algunas con funciones aún no descritas) que son fundamentales para la formación del complejo de replicación- transcripción del ARN del virión, la restante tercera parte, se utiliza para la codificación de proteínas estructurales, S, M, N, E (figura 1) y otras proteínas que varían según el coronavirus, como la proteína HE (esterase de hemaglutinina), proteína 3a/b, 4a/4b. (Sánchez, *et al.*, 2020)

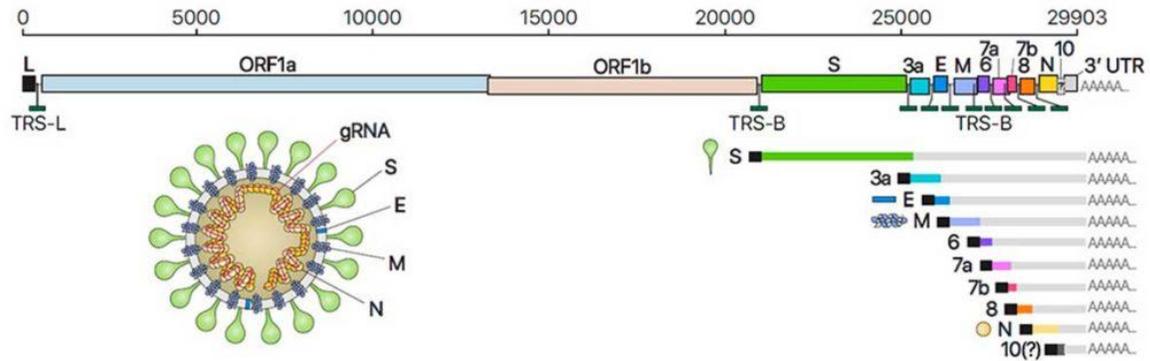


Figura. 1 Composición de ARN genómico de SARS-CoV-2. S: proteína de pico, E: proteína de envoltura, M: proteína de membrana y N: proteína de nucleocápside. Fernández-Rúa, J. M. (2020)

El virus se une a la ACE 2 como receptor de la célula diana del huésped en sinergia con la serina proteasa 2 transmembrana del huésped (proteína de la superficie celular), que se expresa principalmente en las células epiteliales de las vías respiratorias y en las células endoteliales vasculares. Esto conduce a la fusión de la membrana y libera el genoma viral en el citoplasma del hospedador (figura 2). Las etapas (3-7) muestran los pasos restantes de la replicación viral, que conducen al ensamblaje, la maduración y la liberación del virus. (Cevik, *et al.*, 2020)

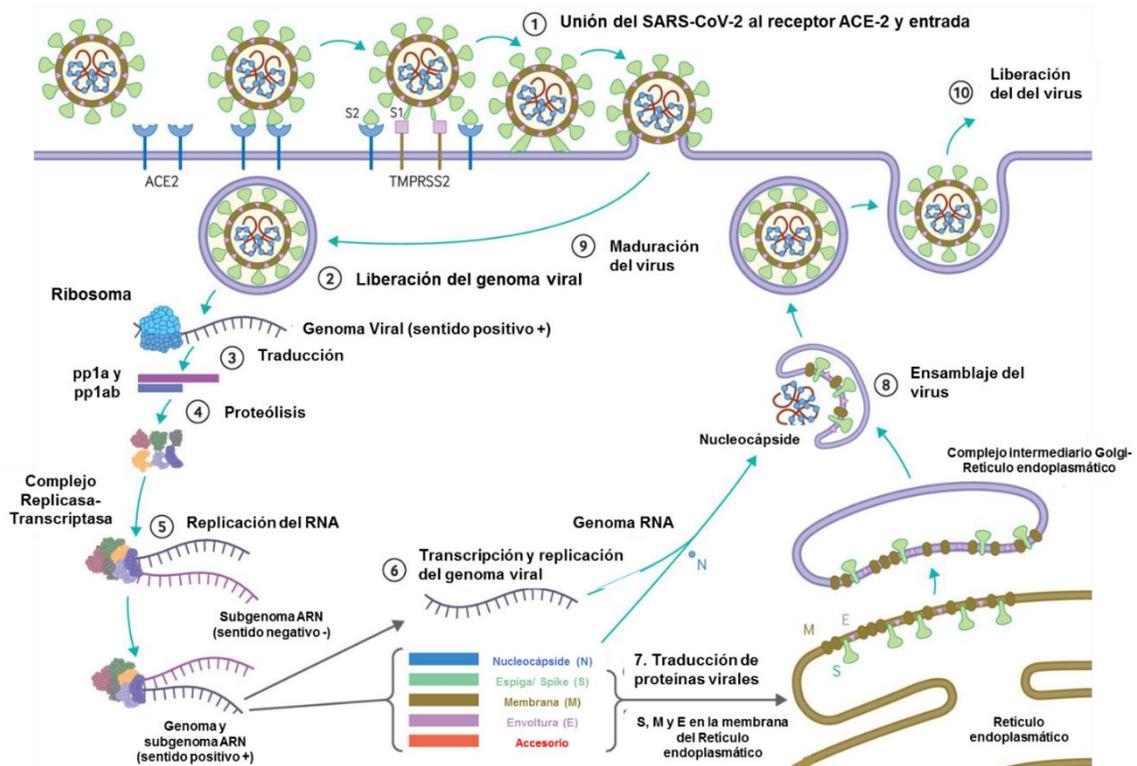


Figura. 2 Replicación virus SARS-CoV-2. Cevik, *et al.*, 2020. Modificado febrero, 2021.

3.6. COVID-19

Después de un período de incubación medio de unos 5 días, una infección típica en COVID-19 comienza con tos seca y fiebre de bajo grado (38.1-39°C). De acuerdo a la OMS (2021) la mayoría de los pacientes presentan fiebre (83%-99%), tos (59%-82%), astenia (44%-70%), anorexia (40%-84%), disnea (31%-40%) y mialgias (11%-35%). También se han descrito otros síntomas inespecíficos, como faringodinia, congestión nasal, cefaleas, diarrea, náuseas y vómitos. Asimismo, se han descrito anosmia (pérdida del olfato) y ageusia (pérdida del gusto) antes del inicio de los síntomas respiratorios. En la mayoría de los pacientes, la COVID-19 sigue siendo leve o moderada y los síntomas se resuelven en el plazo de una semana, por lo que los pacientes suelen recuperarse en casa. Alrededor del 10% de los pacientes permanecen sintomáticos hasta la segunda semana. Cuanto más tiempo persistan los síntomas, mayor será el riesgo de desarrollar una COVID-19 más grave, que requerirá hospitalización, cuidados intensivos y ventilación invasiva. El resultado de COVID-19 es a menudo impredecible, especialmente en pacientes mayores con comorbilidades. (Hoffmann & Kamps, 2021). Los pacientes mayores y aquellos con afecciones médicas subyacentes específicas, se asocian con una mayor gravedad de la enfermedad, mientras que aquellos con múltiples de estos factores de riesgo están asociados con un riesgo aún mayor de enfermedad grave.

Es así como enfermedad COVID-19 puede presentarse como leve, moderada y grave, por lo tanto, las manifestaciones clínicas varían desde formas asintomáticas hasta manifestaciones multiorgánicas y sistémicas con insuficiencia respiratoria que requiere apoyo en una unidad de cuidados intensivos (UCI). Aproximadamente la mitad (49.0%) de los pacientes que mueren presentan comorbilidades preexistentes como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas y enfermedades oncológicas.

La enfermedad leve ocurre en el 81% de los casos con síntomas que incluye fiebre leve, tos (seca), dolor de garganta, congestión nasal, malestar general, dolor de cabeza, dolor muscular o malestar general, sin disnea. En la forma moderada existe

dificultad para respirar sin signos de neumonía severa. Entre las manifestaciones clínicas graves, hay neumonía severa, síndrome respiratorio agudo severo (SDRA), choque séptico y/o disfunción orgánica múltiple (MOD) o falla (MOF) (Cascella, *et al.*, 2020).

Durante la enfermedad COVID-19, la inflamación es una parte esencial de una respuesta inmune, las células inmunes trabajan para eliminar el virus, en parte, sintetizando citocinas inflamatorias. Sin embargo, en algunos individuos el SARS-CoV-2 induce una excesiva y prolongada respuestas de citocinas, conocida como la tormenta de citocinas (Mehta, *et al.*, 2020). Convirtiéndose así en una de las principales causas de la complicación de la enfermedad COVID-19.

Los hallazgos hematológicos más comunes son: linfopenia, neutrofilia, eosinofilia, trombocitopenia leve, y se han descrito algunos casos de trombocitosis. Los recuentos absolutos de neutrófilos aumentan en los primeros días tras del ingreso ($> 5 \times 10^9 / L$ en 14/40 casos), y comienzan a disminuir una semana después. Se ha demostrado que los linfocitos expresan el receptor ACE-2 en su superficie; por lo tanto, el virus puede infectar directamente estas células y finalmente producir lisis (Espinoza, *et al.*, 2020).

3.7. COVID-19 Leve-Moderado

Los casos leves son aquellos pacientes con sospecha o caso confirmado por COVID-19, constituyen 40% de los casos, es decir, los pacientes que tienen muy pocos síntomas o son asintomáticos y cumplen con la definición de caso por COVID-19. Estos pacientes no tienen evidencia de neumonía ni de hipoxemia (OMS, 2021), dicho parámetro es lo que hace la diferencia con los casos moderados y pueden no tener ningún síntoma o solamente tener anosmia y disgeusia o algún síntoma general que puede ser controlable con analgésicos o antipiréticos (Sosa, 2020).

Los casos moderados también afectan a 40% de los casos, esto quiere decir que 80% de los casos con COVID-19 son de leves a moderados y se pueden atender desde el domicilio o en lugares apropiados para que lleven a cabo la convalecencia. Existe presencia de neumonía, y por lo tanto signos clínicos de neumonía como fiebre, tos,

disnea, taquipnea, pero sin datos de neumonía grave, lo que incluye la presencia de desaturación; al momento de medir la saturación en estos pacientes deberá ser igual o mayor de 90% al aire ambiente, es decir, sin oxígeno suplementario. El diagnóstico en este caso puede ser clínico, radiográfico, por medio de una tomografía de tórax o a través de otras herramientas como el ultrasonido, lo que puede ayudar en el diagnóstico para identificar o excluir alguna otra complicación que se puede presentar en estos pacientes (Sosa, 2020).

3.8. COVID-19 Grave

Los casos graves constituyen 15% del total de los casos y se asocian con la presencia de una neumonía grave, es decir, los signos clínicos de neumonía fiebre, tos, disnea y taquipnea, pero en este caso el paciente presenta desaturación con hipoxemia menor de 90% al aire ambiente, así como insuficiencia respiratoria con hasta más de 30 respiraciones por minuto. Esto es lo que diferencia un caso grave con neumonía de un caso moderado, y se puede atender en diferentes instancias dependiendo de la situación clínica de cada paciente (Sosa, 2020).

3.9. COVID-19 crítico

El 5% de los casos con COVID-19 son pacientes críticos, es decir, son aquellos pacientes que evolucionan dentro de la primera semana de la afectación y cursan con neumonía o síntomas respiratorios que pueden ser nuevos o que se van deteriorando progresivamente (Sosa, 2020). Estos pacientes tienen alto riesgo de complicación como falla respiratoria aguda y síndrome de insuficiencia respiratoria aguda y en caso de que lleguen a presentar alguna coinfección, pueden cursar con sepsis grave, choque séptico y también pueden iniciar con enfermedad tromboembólica venosa, falla multiorgánica por la presencia de lesión renal aguda y falla cardiaca (Sosa, 2020). En la mayoría de estos pacientes, el principal órgano afectado es a nivel respiratorio y pueden llegar a presentar otras complicaciones menos frecuentes como a nivel renal, a nivel cardiaco o la presencia de eventos tromboembólicos venosos. Requieren un mayor nivel de atención en áreas especiales donde se les pueda dar el soporte y manejo adecuado en cuanto al cuidado crítico (Sosa, 2020).

Intensivistas del Grupo de estudio COVID-19 de la Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) han presentado un estudio que analiza al mayor número de pacientes críticos hasta la fecha en España. Un total de 2.022 casos han permitido trazar un perfil del ingresado en las UCI entre marzo y mayo de 2020, es decir, durante la primera ola de la pandemia, e incluso definir tres fenotipos. (Rodríguez, *et al.*, 2021)

El perfil más común de paciente crítico fue el siguiente:

- **Edad:** edad media joven, de 64 años (55-71 años).
- **Sexo:** principalmente varón (70%)
- **Factores de riesgo:** presentados por un 73% de los pacientes. Hipertensión arterial (46%), obesidad (35%) y diabetes mellitus (20%).
- **Necesidad de ventilación mecánica:** 76%
- **Estancia media en UCI:** 14 días (8-27 días)
- **Mortalidad global observada:** 32% (sube al 37% en los pacientes que necesitaron ventilación mecánica, por un 17% de los que no necesitaron esta asistencia).

Se ha podido observar, gracias al estudio realizado por Rodríguez, *et. al.* (2021), que los pacientes críticos pueden ser agrupados en tres fenotipos, los cuales se diferencian no solo clínicamente, sino también por su estado de inflamación y por la evolución final:

- ✓ El **fenotipo A** se corresponde con pacientes menores de 65 años, con escasa inflamación y poco desarrollo de complicaciones con una mortalidad del 20%. El cuadro más leve apareció en el 27% de los pacientes.
- ✓ El **fenotipo B** representa a pacientes con un nivel medio de gravedad e incluye a pacientes menores de 65 años, pero con mayor estado de inflamación y desarrollo de shock, lo cual condiciona una mortalidad del 25%.
- ✓ El **fenotipo C**, el más frecuente, afectó a más del 40% de los pacientes. Representa a los enfermos más graves, con una mortalidad del 40%. Este grupo lo conforman personas mayores a 65 años, con antecedentes de enfermedad

hematológica y con un mayor riesgo de desarrollar complicaciones graves como el shock o la insuficiencia renal aguda por su mayor estado inflamatorio.

La importancia de evaluar las características de un paciente de COVID-19 en estado crítico radica en que al diferenciar el tipo particular de paciente se puede permitir un tratamiento más personalizado y, posiblemente, una mejor evolución y pronóstico.

3.10. Manifestaciones clínicas

Como ya se ha mencionado, COVID-19 tiene un gran espectro de signos y síntomas, predominantemente se presenta con tos y fiebre, lo que resulta en una proporción de pacientes que desarrollan síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA); también puede causar síntomas gastrointestinales como diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal, los cuales se han reportado entre el 11,5 %-32 % de los pacientes (Parra, *et al.*, 2020). Cada manifestación clínica varía dependiendo de la etapa en la que se encuentre el paciente, así como de su evolución. De Francisco *et al.* (2020) describen las 3 fases de la enfermedad COVID-19 (figura 4):

- **Fase I: Infección temprana (día 1 a día 6-8). Gran carga viral en secreciones rinofaríngeas**

La etapa inicial ocurre en el momento de la inoculación y el establecimiento temprano de la enfermedad. Para la mayoría de las personas, esto implica un período de incubación asociado con síntomas leves y a menudo no específicos, como malestar general, fiebre y tos seca. Durante este período, el COVID-19 se multiplica y establece la residencia en el huésped, centrándose principalmente en el sistema respiratorio, uniéndose a las células utilizando el receptor ACE-2 (pulmón, intestino delgado, riñón y endotelio vascular). Como resultado del método de transmisión por aire, así como la afinidad por los receptores ACE-2 del pulmón, la infección generalmente se presenta con síntomas respiratorios y sistémicos leves. En aquellos pacientes que pueden mantener el virus limitado a esta etapa de COVID-19, el pronóstico y la recuperación son excelentes.

- **Fase II: Inflamatoria pulmonar: afectación pulmonar sin hipoxia (IIa) y con hipoxia (IIb) (7-10 día)**

Es la etapa de afectación inflamatoria pulmonar. Los pacientes desarrollan una neumonía viral, con tos, fiebre y posiblemente hipoxia (definido como un PaO₂ / FiO₂ de < 300 mmHg). Se observan infiltrados bilaterales u opacidades en vidrio esmerilado.

Los hallazgos tomográficos en pacientes con COVID-19 se han clasificado en: típicos, es decir, que hay opacidades múltiples en vidrio esmerilado de distribución periférica y basal, engrosamiento vascular, patrón empedrado o adoquín desordenado (crazy paving); hallazgos atípicos, es decir, opacidades en vidrio despulido parahiliares, apicales y linfadenopatía y hallazgos muy atípicos, o en otras palabras, cavitaciones, calcificaciones, patrón nodular, árbol en gemación, masas y engrosamiento pleural. Con base en ello, surgió la clasificación CO-RADS, la cual es un sistema de notificación estandarizado para pacientes con sospecha de infección por COVID-19; ésta asigna un nivel de sospecha para la enfermedad según los hallazgos encontrados en la imagen por TC (figura 3). Éstos van desde muy bajo, CO-RADS 1, hasta muy alto, CO-RADS 5, y CO-RADS 6 que corresponde a pacientes con hallazgos típicos y PCR positivo. (Elizalde, *et al.*, 2020).

Escala CO-RADS		
Clasificación	Sospecha	Hallazgos tomográficos
CO-RADS 1	No	Normal o sin anomalías infecciosas
CO-RADS 2	Baja	Anormalidades consistentes con infecciones que no son COVID-19
CO-RADS 3	Indeterminada	Indeterminado o no concluyente
CO-RADS 4	Alta	Anormalidades sospechosas de COVID-19
CO-RADS 5	Muy alta	Hallazgos típicos de COVID-19
CO-RADS 6	PCR positiva	

Figura. 3 Nivel de sospecha por puntaje CO-RADS según los hallazgos tomográficos (Elizalde, *et al.*, 2020. Guía COVID-19 para la atención del paciente crítico con infección por SARS-CoV-2).

Esta escala fue desarrollada para un entorno de prevalencia de moderada a alta y con el fin de clasificar y reportar casos sospechosos; debe considerarse el tiempo de evolución de la enfermedad recordando que en etapas tempranas no hay cambios imagenológicos en la mayoría de los casos. Éstos han sido reportados con mayor frecuencia entre 10 y 13 días después del inicio de los síntomas. (Elizalde, *et al.*, 2020)

Los análisis de sangre, en esta fase, revelan un aumento de la linfopenia, junto con elevación de transaminasas y a veces procalcitonina baja. Los marcadores de inflamación sistémica pueden estar elevados, pero no notablemente. En esta etapa es cuando los pacientes necesitarían ser hospitalizados para una observación y tratamiento cercanos.

- **Fase III: Inflamación sistémica extrapulmonar**

Una minoría de pacientes con COVID-19 pasará a la tercera y más grave etapa de la enfermedad, que se manifiesta como un síndrome de hiperinflamación sistémica extrapulmonar. En esta etapa, se elevan los marcadores como la IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, el factor estimulante de colonias de granulocitos, la proteína inflamatoria de macrófagos 1-alfa, el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), la PCR, la ferritina y el dímero-D.

Están significativamente más elevados en aquellos pacientes con enfermedad más grave. La troponina y el péptido natriurético de tipo B N-terminal pro (NT-proBNP) también pueden estar elevados. Se puede presentar un síndrome hemofagocítico, shock, vasoplejia, insuficiencia respiratoria e incluso, fracaso multiorgánico con afectación sistémica, incluida miocarditis.

En general, el pronóstico es grave y la recuperación de esta etapa crítica de la enfermedad es pobre.



Figura. 4 Etapas de la enfermedad COVID-19. (Leonard, 2020)

Los intentos de correlacionar las etapas de la enfermedad clínica descritas anteriormente con las cargas virales del SARS-CoV-2 de las secreciones respiratorias, la sangre y los tejidos han sido pocos y, en algunos casos, controversiales ya que algunos pacientes con enfermedad avanzada tienen cargas virales elevadas mientras que otros no. (Leonard, 2020)

3.11. Factores de Riesgo

Dentro de los factores de riesgo para tener un peor pronóstico en caso de infección por el virus SARS-CoV-2 se encuentran los siguientes: tabaquismo, edad mayor a 60 años (debido al fenómeno conocido como inmunosenescencia), ser de sexo masculino (Silva, *et al.*, 2021), padecer enfermedad cardiovascular, diabetes, hipertensión arterial, enfermedades pulmonares, cáncer y obesidad. Se conoce también que estas enfermedades mencionadas se relacionan entre sí porque comparten un origen común en desarreglos metabólicos a los que subyace la resistencia a la insulina (síndrome metabólico). Esta resistencia a la acción de la insulina ha sido identificada como un

factor condicionante de la respuesta inmunológica necesaria para combatir las infecciones. (López, *et al.*, 2020)

Los factores de riesgo conocidos de deterioro rápido, enfermedad grave o aumento de la mortalidad son la edad avanzada (> 60 años) y las enfermedades no transmisibles preexistentes como la diabetes, la hipertensión, las cardiopatías, las neumopatías crónicas, las enfermedades cerebrovasculares, la demencia, los trastornos psiquiátricos, las nefropatías crónicas, la inmunodepresión, la obesidad o el cáncer. Los pacientes con uno o más de estos factores de riesgo deben ser objeto de un estrecho seguimiento, de preferencia en un establecimiento sanitario, con el fin de detectar el deterioro de su estado (OMS, 2021).

3.12. Carga Viral

La cantidad de carga viral también podría ayudar a que los médicos predigan la evolución de un paciente. Un estudio elaborado por la Escuela Icahn de Medicina del Hospital Monte Sinaí en Nueva York (2020) concluyó que las personas cuyos cuerpos reportaban una gran cantidad de coronavirus a menudo se enfermaban de manera grave y tenían más probabilidades de morir, en comparación con los que portaban mucho menos virus y era más probable que salieran relativamente ilesos.

En el tracto respiratorio, la carga máxima de SARS-CoV-2 se observa en el momento de la aparición de los síntomas o en la primera semana de la enfermedad con una disminución posterior a partir de entonces, lo que indica el mayor potencial de infecciosidad justo antes o dentro de los primeros cinco días de la aparición de los síntomas. (Cevik, *et al.*, 2020). El estudio de la carga viral en COVID-19, obtenido a partir de los sitios de recolección distintas incluyendo nasofaringe, esputo, saliva, plasma, orina y heces, han demostrado que la información obtenida de cada uno de estos sitios no siempre es sinónimo de gravedad, esto debido a la gran heterogeneidad de los pacientes afectados por la COVID-19. (Rodríguez, *et al.*, 2021).

Después de la exposición inicial, los pacientes suelen desarrollar síntomas dentro de 5-6 días (período de incubación). El SARS-CoV-2 genera una amplia gama de

manifestaciones clínicas, como ya se ha mencionado, que van desde una infección leve hasta una enfermedad grave acompañada de una alta mortalidad. En pacientes con infección leve, la respuesta inmune inicial del huésped es capaz de controlar la infección. En la enfermedad grave, la respuesta inmune excesiva conduce a daño orgánico, ingreso en cuidados intensivos o muerte. En pacientes con la enfermedad leve o moderada, la carga viral alcanza su punto máximo en la primera semana de infección, luego disminuye gradualmente, mientras que la respuesta de anticuerpos aumenta gradualmente y a menudo es detectable el día 14. (Cevik, *et al.*, 2020). La asociación de la carga viral nasofaríngea con la gravedad de la enfermedad ha sido la más estudiada. Si bien algunos estudios han demostrado que las cargas virales nasofaríngeas altas al ingreso se asocian significativamente con un mayor riesgo de mortalidad, edad avanzada y algunos factores de riesgo para la salud de COVID-19, y otros han mostrado una disminución constante de la carga viral nasofaríngea entre los hospitalizados con enfermedad, otros estudios no han encontrado estas asociaciones y aún se encuentra en controversia (Silva, *et al.*, 2021). Sin embargo, en varios estudios se ha demostrado que la carga viral nasofaríngea se correlaciona positivamente con importantes factores inflamatorios observados en el SARS-CoV-2, incluidos el TNF- α y los interferones de tipo I y II, y la viremia plasmática, que también se ha asociado con la gravedad de la enfermedad, con la linfopenia (Silva, *et al.*, 2021).

Se ha observado que los infectados presentan en su mayoría una carga viral alta (hasta 10^4 y 10^8 copias de genoma/ml por muestra nasofaríngea o de saliva). En pacientes que tienen un curso leve de infección, el pico de la carga viral en muestras nasales y orofaríngeas ocurre durante los primeros 5-6 días tras el inicio de síntomas y prácticamente desaparece al día 10. Si bien en algunos pacientes se detecta virus más allá del día 10, la carga viral es del orden de 100-1.000 veces menor, lo cual sugeriría una baja capacidad de transmisión en estos días (Wölfel, 2020). En personas con un curso clínico más grave la carga viral es de hasta 60 veces mayor que las que tienen un curso más leve y, además, la excreción viral puede ser más duradera incluso hasta que fallecen como se observa en la figura 5. (Liu, 2020).



Figura. 5 Dinámica de la reducción de la carga viral en diferentes grados del desarrollo de la enfermedad (COVID-19). Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2020. Modificado octubre, 2020.

Silva, *et al.* (2020) sugieren que la forma proinflamatoria observada en COVID-19 grave puede estar impulsada por cargas virales más altas. Además, revelan un modelo inmunológico asociado con cargas virales más bajas, menor gravedad y mortalidad. En su estudio los pacientes que sobrevivieron mostraron una disminución constante y significativa de la carga viral con el tiempo, mientras que aquellos con enfermedad fatal no pudieron controlar la carga viral de saliva y/o exudado nasofaríngeo. Además, la carga viral (obtenida de cualquiera de los métodos de recolección) se correlacionó positivamente con muchos marcadores importantes de inflamación, incluidos IFN- α e IFN- γ , citocinas del inflamasoma (IL-1 β , IL-1ra), citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10), así como con CXCL10 y muchas otras quimiocinas responsables del reclutamiento de monocitos, células T y otros leucocitos. Es importante estudiar las asociaciones de la carga viral en muestras respiratorias con factores de riesgo conocidos y fenotipos característicos de la enfermedad como fuerte inducción de citocinas, linfopenia y su asociación con respuestas inmunes humorales inmaduras.

3.13. Tormenta de citocinas

Se ha encontrado que diversos virus patógenos (p. ej., influenza A y ahora el SARS-COV-2) y bacterias (como *Francisella tularensis*) inducen la tormenta de citocinas o la hipercitocinemia. Estos patógenos inducen el quiebre del delicado equilibrio de una respuesta inflamatoria adecuada, y se inclinan a un desenlace destructivo dada la inducción de la retroalimentación positiva no controlada en las células inmunes y la regulación positiva de producción de marcadores proinflamatorios, en particular las citocinas TNF- α , IL-1, IL-8 e IL-6. Un perfil de citocinas asociado con el síndrome respiratorio severo se ha relacionado con la gravedad de COVID-19 (Parra, *et al.*, 2020).

En algunos pacientes con la forma más severa de COVID-19 se produce esta tormenta de citocinas. Las citocinas son sustancias muy agresivas que el sistema inmune excreta para atacar al virus. Pero cuando el sistema inmune se activa en exceso, esta proliferación de citocinas acaba atacando múltiples órganos incluidos los pulmones y el riñón, y este daño puede resultar en la muerte del paciente. (Plitt, 2020)

Las citocinas son pequeños péptidos que actúan como mensajeros intercelulares. Como el sistema inmunitario está formado por una extensísima trama de tejidos y células dispuesto por el organismo o en circulación, la red de citocinas que actúan sobre el mismo es muy extensa. Estas citocinas, que son liberadas por leucocitos u otras células (principalmente epiteliales), van a mediar en el ámbito local y de forma autocrina y paracrina cualquier tipo de cambio en la fisiología de la célula, desde la proliferación hasta la apoptosis y la migración celular. Pero hay un grupo de citocinas que se denominan pro-inflamatorias que actúan tanto de forma local con el fin de activar y reclutar células al tejido infectado como de forma sistémica regulando el centro termorregulador del hipotálamo posterior y la liberación de mediadores inmunológicos por el hígado. Estas citocinas son la interleucina 1 (IL-1), la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). A la vez que se produce esta respuesta inflamatoria, con el fin de contenerla y permitir la homeostasia inmunitaria, se liberan citocinas inmunorreguladoras como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante

beta (TGF-beta). Para preservar la integridad tisular, o incluso la viabilidad del individuo, es vital que esté bien equilibrado este binomio pro y anti-inflamatorio (Sládková, Kostolansky & Frantisek, 2006).

La tormenta de citocinas, manifiesta niveles séricos elevados de IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , TNF α , IP10, MCP1, MIP1A y MIP1B. Los pacientes con mayor gravedad tienen niveles aún más altos de IL-2, IL-7, IL10, G-CSF, IP10, MCP1, MIP1A y TNF α . (López, *et al.*, 2020). Cuando las citocinas que aumentan la actividad inmune se vuelven demasiado abundantes, es posible que el sistema inmunológico no pueda detenerse. Las células inmunes se propagan más allá de las partes infectadas del cuerpo y comienzan a atacar tejidos sanos, devorando glóbulos rojos y blancos y dañando el hígado. Las paredes de los vasos sanguíneos se abren para permitir que las células inmunes entren en los tejidos circundantes, pero los vasos empiezan a tener tantas filtraciones que los pulmones pueden llenarse de líquido y la presión sanguínea empieza a bajar. Comienzan a formarse coágulos de sangre en todo el cuerpo, lo que ahoga aún más el flujo sanguíneo. Cuando los órganos no reciben suficiente sangre, el cuerpo puede entrar. (Amber, 2020)

Los síntomas principales de una tormenta de citocinas son fiebre alta, inflamación y enrojecimiento, fatiga extrema y náuseas. Cerca de la mitad de los pacientes que experimentan una tormenta tendrá algunos síntomas del sistema nervioso, como dolores de cabeza, convulsiones o incluso un coma. En algunos casos, la reacción inmune puede ser fatal, como en COVID-19. (Parra, *et al.*, 2020)

La inflamación asociada con una tormenta de citocinas comienza en el sitio local y se extiende por todo el organismo a través de la circulación sistémica. Estas respuestas a menudo ocurren con el gasto de la función del órgano local, particularmente cuando el edema tisular provoca un aumento en las presiones extravasculares y una reducción en la perfusión del tejido. Los procesos de reparación compensatorios se inician poco después de comenzar la inflamación y, en muchos casos, el proceso de reparación restaura por completo la función de tejidos y órganos. Cuando la inflamación grave o el agente etiológico primario que desencadena la inflamación (por ejemplo, SARS-CoV-2)

daña las estructuras locales del tejido, la reparación ocurre con fibrosis, lo que puede provocar disfunción orgánica persistente. La lesión pulmonar aguda es una consecuencia común de una tormenta de citocinas, como la descrita en COVID-19 en el ambiente alveolar y en la circulación sistémica. Esta respuesta se caracteriza por un infiltrado inflamatorio mononuclear y neutrofílico agudo, seguido de una fase fibroproliferativa crónica marcada por el depósito progresivo de colágeno en el pulmón. La lesión pulmonar inducida por patógenos puede progresar hacia lesión pulmonar aguda o, su forma más grave, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), llevando en muchos casos a desenlaces fatales. Los macrófagos activados por el SARS-CoV-2 están directamente relacionados con la fibrosis, dado que ellos son los responsables de eliminar a través de su actividad fagocítica los detritus derivados de las células y tejidos muertos (DAMP: patrones moleculares asociados al daño), evitando que estos se unan a PRR (receptores de patrones reconocimiento) e induzca inflamación (Parra, *et al.*, 2020).

El SARS-CoV-2 ingresa a las células diana (células epiteliales alveolares) donde interactúa con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE-2), produciendo una activación de células como: Th1 patógenas, monocitos CD14+ CD16+, macrófagos alveolares y linfocitos Th17. Posteriormente estas células serán las encargadas de producir y liberar cantidades excesivas de citocinas, las cuales mantendrán el estado hiperinflamatorio pulmonar acompañado de una infiltración de neutrófilos y macrófagos hacia este tejido como se puede observar en la figura 6.

Cuando el virus entra, su antígeno es presentado por células presentadoras de antígenos. Los péptidos antigénicos son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad. La presentación de antígenos luego estimula la inmunidad humoral y celular del organismo, que están mediadas por células B y T virus-específico. La infección celular y la replicación viral causan la activación del inflamasoma en la célula huésped, lo que conduce a la liberación de citocinas proinflamatorias y la muerte celular por piroptosis. (Pelaia *et al.*, 2020)

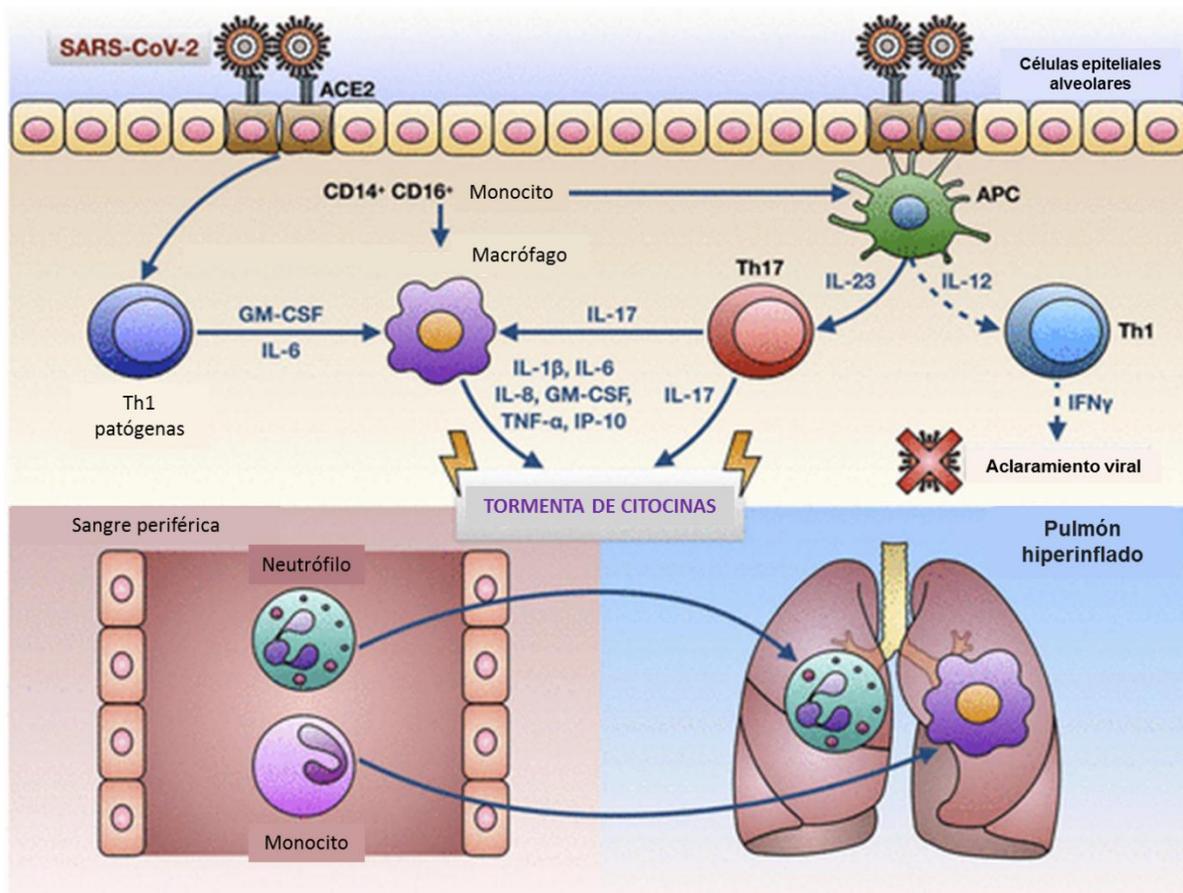


Figura. 6 Mecanismos hipotéticos subyacentes a la tormenta de citocinas inducida por SARS-CoV-2 en pulmones infectados. (Pelaia *et al.*, 2020) Modificado Febrero, 2021.

El TNF- α y la IL-1 se producen en los pulmones de pacientes con COVID-19 y son fuertes inductores de hialurano sintetasa en células epiteliales CD31⁺, células epiteliales alveolares EpCAM⁺, y fibroblastos. La hialurano sintetasa puede reducir el hialurano, lo que minimizará la absorción de agua y la formación de una gelatina que invade el pulmón y que contribuye al estrés respiratorio (Lozada, *et al.*, 2020)

Aunque no hay una prueba de diagnóstico infalible, hay signos de que puede haber una tormenta (Amber, 2020). Clínicamente, en la tormenta de citocinas observada en pacientes con COVID-19, se han destacado anomalías importantes en pruebas de laboratorio como el aumento de los valores de proteína C reactiva (PCR), incremento de Ferritina Sérica, Velocidad de sedimentación globular (VSG), y Dímero D, junto con la disminución de la concentración de albúmina sérica. Se ha encontrado que varios parámetros hematológicos predicen la progresión hacia formas graves o críticas de

COVID-19 (Espinoza, *et al.*, 2020). Para fines de pronóstico, también valores elevados de LDH, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina total, creatinina, troponinas cardíacas, dímero D, tiempo de protrombina (TP), procalcitonina y PCR, junto con valores disminuidos de suero albúmina, se han encontrado de valor predictivo. Algunos de estos parámetros (Biometría hemática, PCR, Ferritina, Dímero-D, LDH) han demostrado ser muy buenos predictores de severidad de la enfermedad por SARS-CoV-2 (Espinoza, *et al.*, 2020).

3.13.1. Ferritina

Las células reaccionan al estrés debido a la inflamación, produciendo grandes cantidades de ferritina sérica. De los parámetros de laboratorio, se ha considerado a la hiperferritinemia como el mejor indicador de la presencia de esta respuesta inmune exagerada (tormenta de citocinas). (Espinoza, *et al.*, 2020). Es importante en cuanto al incremento en los valores de ferritina considerar valores de < 2000 ng/ml, entre 2000 y 6000 ng/ml y > 6000 ng/ml. La afectación pulmonar, incluido el SDRA, ocurre aproximadamente en el 50% de los casos. Según estudios se hallaron valores de ferritina con una media de 1.297,6 ng/ml en no sobrevivientes frente a 614,0 ng/ml en sobrevivientes. Otros autores obtuvieron valores de 800,4 ng/ml en pacientes severos versus 523,7 ng/ml en pacientes no severos; 1.435,3 ng/ml en no sobrevivientes versus 503,2 ng/ml en sobrevivientes (ambos con <0,001). (Guan, *et al.* 2020). Es importante recordar que el incremento de ferritina es como se ha explicado, secundario al síndrome de tormenta de citoquinas, por lo que no tiene ninguna relación ni se ha asociado a sobrecarga de hierro, esto se verifica solicitando valores de hierro sérico, los cuales siempre son normales, por lo que es importante destacar que no es necesario el tratamiento con quelantes de hierro bajo ninguna circunstancia. (Espinoza, *et al.*, 2020).

Con respecto a la ferritina, Wu *et al.* (2020) mostró que una ferritina sérica más alta se asoció con el desarrollo de SDRA. En su análisis univariante, Zhou *et al.* (2020) apoyó una asociación entre los niveles de ferritina sérica más altos y la muerte.

3.13.2. Proteína C Reactiva (PCR)

La determinación de marcadores de inflamación séricos se emplea cada vez con más frecuencia para el diagnóstico y el pronóstico de diversas enfermedades críticas. La proteína C reactiva (PCR) es una proteína pentamérica sintetizada principalmente por los hepatocitos en respuesta a procesos infecciosos, inflamatorios y de injuria tisular. La interleucina (IL) 6, la IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) causan su inducción. (Flores, *et al.* 2008)

Además de ser un indicador de inflamación, esta proteína se encuentra involucrada en diversas funciones inmunomoduladoras como la amplificación de la capacidad del complemento, la opsonización de bacterias y la estimulación de células fagocíticas. A diferencia de la velocidad de sedimentación globular, la PCR se eleva más rápidamente en respuesta a los estímulos y sus concentraciones séricas disminuyen velozmente cuando éstos cesan. No presenta diferencias por sexos ni sus valores se ven afectados por otras condiciones como anemia, policitemia o morfología eritrocitaria. (Flores, *et al.* 2008)

La PCR, como muchas proteínas de fase aguda, se encuentra normalmente en concentraciones séricas < 0,1-0,2mg/dl. Sin embargo, puede elevarse a valores entre 0,2 y 1mg/dl debido a ciertas condiciones clínicas que cursan con un grado leve de inflamación, como osteoartritis, obesidad, tabaquismo, fallo renal, hipertensión arterial, enfermedad coronaria y/o enfermedad periodóntica. (Flores, *et al.* 2008) Es un marcador bioquímico de inflamación. Se han hallado medias de 57,9 mg/L en pacientes con COVID-19 severo versus 33,2 mg/L en no severos (p<0,001) (Shi, *et al.* 2020).

Frente al estímulo inflamatorio los valores de PCR aumentan en las primeras 6 a 8h y alcanzan un pico máximo a las 48h para descender rápidamente, con una vida media de eliminación que oscila entre 4 y 9h. Esto hace que pueda ser útil también como marcador evolutivo en las enfermedades inflamatorias crónicas. (Flores, *et al.* 2008)

3.13.3. Interleucina 1 (IL-1)

Los niveles circulantes de IL-1 se elevan en una variedad de situaciones clínicas y junto con los niveles elevados de TNF e IL-6 correlacionan con la severidad de algunas patologías, debido a su gran actividad proinflamatoria, sugiriendo que estas citocinas participan en la respuesta del huésped para el desarrollo de la enfermedad. La producción de IL-1 en los tejidos contribuye a efectos locales como la fibrosis, rompimiento de tejidos de matriz o al influjo de células inflamatorias (Castrillón, *et al.* 2007). La IL-1 es el prototipo de citocina proinflamatoria que induce la expresión de una variedad de genes y la síntesis de varias proteínas que inducen cambios en la inflamación aguda y crónica. Esta interleucina es el mediador de las respuestas de defensa del organismo, sin embargo, cualquiera que sea la situación, la sobreproducción sostenida de esta molécula lleva a la debilidad de las funciones normales del huésped y por lo tanto la reducción en su síntesis o de sus funciones efectoras es el blanco terapéutico de muchas enfermedades. (Castrillón, *et al.* 2007).

La producción de IL-1 puede ser inducida por una variedad de agentes como son los microorganismos, productos microbianos, agentes inflamatorios, lectinas de plantas y antígenos. Tiene efectos locales y sistémicos sobre las células inmunocompetentes y otras que participan en las reacciones inflamatorias. Algunos de estos efectos incluyen la activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos B y la estimulación de éstos para la síntesis de anticuerpos. También afecta la quimiotaxis de neutrófilos y células mononucleares y participa en la modulación de la función de las células endoteliales como lo es en la liberación de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina E₂ (PGE₂) y en la síntesis de factor activador de plaquetas (PAF, por sus siglas en inglés). Por acción de la IL-1 se aumenta la actividad del PAF y del factor tisular procoagulante (PCA), también aumenta la adhesión de leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos y líneas celulares de leucocitos. (Castrillón, *et al.* 2007). La IL-1 comparte muchos efectos biológicos con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), aunque son estructuras diferentes y actúan sobre receptores de membrana distintos. Las dos citocinas activan la proliferación de linfocitos T. Pueden promover la respuesta

inmunitaria, tanto humoral como celular. La IL-1 puede ser producida por todos los tipos de células nucleadas, principalmente por la línea de monocitos-macrófagos, linfocitos B, asesinas naturales (NK), células dendríticas y endoteliales. Hay dos tipos de IL-1, con moléculas distintas; el alfa y beta, semejantes solo en un 26%, pero que se fijan a los mismos receptores. Varios estudios han reportado que la IL-1 β produce elevación de las concentraciones y del sistema de receptores de interleucina 6 (IL-6). Además, la IL-1 β puede inducir la expresión de IL-6 a través del factor kB nuclear (Jiang, *et al.*, 2006).

Se ha visto que otro mecanismo que se activaría por la unión del ARN viral de SARS-CoV-2 al receptor tipo Toll (TLR-9) es la producción de IL-1 β que se produce a través de la activación del inflamasoma. (Lozada, *et al.*, 2020)

3.13.4. Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 es producida por diversos tipos celulares: monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, fibroblastos, células endoteliales, sinoviocitos, células de la glía, adipocitos y células epiteliales intestinales, entre otras. Los principales estímulos para su síntesis y liberación son las infecciones por ciertos microorganismos, particularmente virus y bacterias (lipopolisacárido bacteriano) y la acción de otras citocinas, como la IL-1, TNF- α y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Asimismo, sus principales objetivos o dianas celulares son los linfocitos T y B, las células epiteliales, los monocitos/macrófagos y los hepatocitos. Es una citocina pluripotencial ya que tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. (Saavedra, *et al.* 2011). Es la principal estimuladora de la producción de la mayoría de las proteínas de fase aguda, como, por ejemplo: proteína C-reactiva, amiloide sérico A, ceruloplasmina, haptoglobina, hemopexina, ferritina, algunas proteínas del sistema del complemento, diferentes proteínas de la cascada de la coagulación y del sistema fibrinolítico, etc.

La IL-6 es, junto con IL-1, TNF- α e interferón gamma, un regulador importante de la termogénesis corporal y su papel como pirógeno endógeno está ampliamente demostrado. De hecho, se sabe que la IL-6 secretada en el tallo cerebral es

indispensable para la producción de las etapas finales que conducen a la fiebre (Saavedra, *et al.* 2011)

La IL-6 se encuentra también involucrada en la patogénesis de ciertos fenómenos asociados con sepsis grave y otras enfermedades críticas, como, por ejemplo, alteración del estado mental y fatiga, hiperglucemia, resistencia a la insulina, disfunción miocárdica, atrofia muscular esquelética, anorexia y caquexia del cáncer. En pacientes sépticos, la concentración circulante elevada de IL-6 se correlaciona significativamente con un incremento en el riesgo de muerte. (Saavedra, *et al.* 2011). La IL-6 que es inducida por el estrés biológico tiene múltiples efectos en diversos tejidos, su producción y niveles circulantes correlacionan positivamente con el índice de masa corporal (IMC) y se ha señalado que una tercera parte de esta citocina se produce en las células adiposas donde tiene efectos autocrinos y paracrinos. La IL-6 que se produce y llega al hígado promueve la secreción hepática de triglicéridos, contribuyendo a la hipertrigliceridemia, recordemos además que en hígado estimula de la síntesis de proteínas de fase aguda como la PCR (González, *et al.* 2002).

La IL-6 es otro biomarcador emergente para el curso de la enfermedad COVID-19. En el estudio de Chen *et al.* El 52% (51/99) de los pacientes tenían niveles elevados de IL-6 al ingreso. Los niveles elevados de IL-6 se han asociado con un mayor riesgo de muerte, y se ha informado un aumento gradual durante la hospitalización en los no sobrevivientes. (Espinoza, *et al.*, 2020)

3.13.5. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citocina proinflamatoria fundamental en la respuesta del sistema inmune contra las infecciones, además de participar en la patogénesis inflamatoria de enfermedades crónicas de origen autoinmune (Nava, *et al.*, 2020). Es producido principalmente por macrófagos en respuesta a daño tisular o infección. El señalamiento intracelular mediado por TNF- α se da a través de interacciones con 2 de sus receptores ligados a células: el p55 y el p75. Una señalización exagerada mediada por estos receptores lleva a inflamación severa, daño tisular y choque cardiovascular; pero una producción de TNF- α lenta y continua lleva a

inflamación crónica. El TNF- α actúa a nivel celular y tisular. En el primero, contribuye con la adhesión de linfocitos y neutrófilos, la estimulación de leucocitos, entre otros. A nivel tisular, produce deterioro de proteoglicanos, daño articular, etc. Clínicamente esto se ve en la anorexia, pérdida de peso, fiebre, hemorragia e inflamación. (Vargas, 2009)

La activación de las células T o la lisis de células inmunes induce una liberación de IFN gamma o TNF- α . Esto conduce a la activación de macrófagos, células dendríticas, otras células inmunes y células endoteliales. Después de la activación, estas células liberan además citoquinas pro-inflamatorias (Labclinics, 2020). El TNF- α incide en la actividad de otras citocinas inflamatorias como las interleucinas y quimiocinas (IL-1, IL-6 e IL-8), metaloproteinasas y óxido nítrico, importantes en el proceso de inflamación tanto aguda como crónica. (Nava, *et al.*, 2020)

El TNF- α , además de sintetizarse en los macrófagos, linfocitos T, células endoteliales, se produce en los adipocitos maduros donde su expresión es inducida por los ácidos grasos libres y los triglicéridos, y es incrementada hasta 2.5 veces en los sujetos obesos; los niveles de esta citocina también correlacionan positivamente con el grado de obesidad y con la hiperinsulinemia, además en la obesidad el incremento de los niveles del TNF- α induce la expresión de la IL-6. (González, *et al.* 2002)

En los últimos 10 años se han evidenciado asociaciones entre el TNF y un sinnúmero de patologías de fondo infeccioso tales como la malaria cerebral, choque séptico, leishmaniasis y lepra, por otro lado, también se ha asociado a patologías de origen autoinmune como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso. Así como en algunas enfermedades respiratorias como asma, neumonitis por hipersensibilidad (NH), fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, entre otras. (Falfán, 2002)

Se ha demostrado que los niveles elevados de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) se asocian con un aumento de la mortalidad por COVID-19. (Robinson, *et al.* 2020). TNF- α es una citocina proinflamatoria que está íntimamente involucrada en el exceso de inflamación. TNF- α tiene un papel importante en el inicio de la cascada inflamatoria y se eleva al principio del proceso de la enfermedad; sobre esta base, la intervención

temprana puede ser más beneficiosa que la tardía. También coordina el reclutamiento celular mediante la regulación de quimiocinas y moléculas de adhesión. Se ha visto que los niveles de TNF- α son altos en COVID-19 y los niveles tempranos predicen la mortalidad. (Del Valle, *et al.* 2020)

3.14. Diagnóstico

El diagnóstico de COVID-19 incluye PCR de muestra respiratoria, análisis de suero para IgG e IgM de COVID-19, junto con imágenes de tórax, hemograma completo (en el que generalmente se encuentra linfopenia y neutrofilia) y pruebas de función hepática. Yang, *et al.* (2020) describen que los síntomas más frecuentes en el momento del ingreso en todas las series de pacientes que estudiaron fueron la fiebre, la astenia y la tos. El patrón radiológico más frecuente en todas las series fue el infiltrado alveolar. Para el diagnóstico por imagen, el TAC fue mucho más sensible (86%) que la placa de tórax (59%) para la detección de imágenes con patrón de vidrio deslustrado, a veces en parches, siendo infrecuente el patrón intersticial. En los hallazgos de laboratorio el marcador de inflamación fue la proteína C reactiva. Las alteraciones en la coagulación, especialmente del dímero-D y del tiempo de protrombina fueron más frecuentes en pacientes con mayor gravedad. Alrededor de un tercio de los casos también tuvieron marcadores positivos de citólisis hepática. La linfopenia grave fue el hallazgo hematológico más frecuente en los pacientes críticos (mediana 630/mm³). La detección es compleja. El coronavirus vivo se desprende claramente a altas concentraciones de la cavidad nasal, incluso antes del desarrollo de los síntomas (De Francisco, *et al.*, 2020)

Elizalde *et al.*, (2020) describen el diagnóstico de la infección por SARS-CoV-2 en tres pilares:

1. El estudio epidemiológico.
2. Las manifestaciones clínicas.
3. El complemento diagnóstico. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (PCR-RT).

La PCR en tiempo real es el estándar de oro para las infecciones virales similares. El SARS-CoV-2 presenta retos en el diagnóstico debido a su prolongado periodo de incubación (dos semanas), seguido de cinco días de eliminación viral antes de presentar síntomas, tiempo en el que el enfermo asintomático es una fuente de contagio. Por ello, la importancia del diagnóstico temprano y las medidas de contención oportunas. Es muy importante conocer el día de inicio de los síntomas, ya que la PCR se negativiza en muestras nasofaríngeas a partir del día ocho desde el inicio de los síntomas, en el caso de los pacientes con la enfermedad leve (Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias, 2020.) A partir de ello y hasta aproximadamente el día 22 sólo sería positiva en muestras de esputo (vías aéreas inferiores) o heces. Esto significa que a partir del día siete después del inicio de los síntomas, idealmente, la muestra para PCR debería tomarse de esputo o de heces, y habría que utilizar como complemento un test de detección de anticuerpos IgM/IgG (Elizalde, *et al.*, 2020)

3.15. Tratamiento

Diferentes enfoques terapéuticos están bajo evaluación: compuestos antivirales que inhiben los sistemas enzimáticos, aquellos que inhiben la entrada de SARS-CoV-2 en la célula y, finalmente, terapias inmunológicas, incluyendo plasma convaleciente y anticuerpos monoclonales. Algunos moduladores inmunológicos pueden mejorar el sistema inmunitario, otros se supone que reducen la tormenta de citoquinas y el daño pulmonar asociados que se ven en caso severo. (Hoffmann, *et al.*, 2021).

1. Inhibidores de la síntesis de ARN

- ✓ Inhibidores de RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN, ARN-dependent ARN polymerase): Remdesivir, favipiravir, sofosbuvir
- ✓ Inhibidores de Proteasa Lopinavir/r

2. Otros agentes antivirales

- ✓ APN1, Camostat, Umifenovir Hydroxi/cloroquina

3. Anticuerpos

- ✓ Anticuerpos monoclonales: REGN-CoV-2, otros anticuerpos monoclonales
- ✓ Plasma convaleciente

4. Inmunomoduladores

- ✓ Corticosteroides: Dexametasona, hidrocortisona
- ✓ Interferones IFN- α 2b, IFN- β
- ✓ Inhibidores de JAK Baricitinib, ruxolitinib
- ✓ Bloqueadores de citoquinas y terapias anticomplemento: Anakinra, canakinumab, infliximab, mavrimumab, tocilizumab.

3.16. Epidemiología

A la fecha del 9 de marzo del 2021, fueron notificados 116.736.437 casos acumulados confirmados de COVID-19 a nivel global, incluyendo 2.593.285 defunciones, de los cuales 45% de los casos y 48% de las defunciones fueron aportadas por la región de las Américas. En las Américas, entre diciembre del 2020 y febrero del 2021 las subregiones de América del Norte (68.9%) y América del Sur (28.5%) contribuyeron con la mayor proporción de casos (PAHO, 2021).

Hasta el día 27 de marzo de 2021, a un año de iniciada la epidemia en México, se han acumulado 2,224,767 casos de COVID-19 notificados al Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedad Respiratoria Viral (SISVER) de la Dirección General de Epidemiología (DGE). Su distribución por sexo son 1,110,545 (49.9%) en mujeres y 1,114,222 (50.1%) en hombres. Se han notificado 201,429 defunciones: las mujeres representan el 37.4% (75,269) y los hombres 62.6% (126,160). La letalidad de nacional es de 9.1% para ambos sexos: 6.8% en mujeres y 11.3% en hombres. El mayor número de casos se presenta entre los 20 y 49 años, 17.4 % de los 20 a los 29 años, 21.4% y 20.4% de los de 30 a 39 años y 40 a 49 años respectivamente. El porcentaje de defunciones aumenta con la edad, la letalidad a partir de los 50 años supera a la reportada a nivel nacional, desde 11% en el grupo de 50 a 59 años hasta 45.3% y 43.4% en los grupos de 80 a 89 años, y 90 y más años (Muñoz, *et al.*, 2021).

Los reportes recientes han demostrado que COVID-19 es una enfermedad poco común en niños, según los datos de casos confirmados del CDC de China el 0.9% son pacientes de entre 0 y 10 años y el 1.2% entre 10 y 19 años, sin mortalidad en niños o en adultos menores de 24 años (Lee, *et al.* 2020)

Existe un alto porcentaje de personas que padecen la forma asintomática de la enfermedad, esto puede estar relacionado a varios factores entre ellos a una respuesta inmune menos robusta, vías respiratorias más saludables debido a poca exposición a contaminantes atmosféricos como humo de cigarrillo y por lo tanto menos trastornos subyacentes. Actualmente hay pocos estudios que relacionen a la forma grave y crítica de la enfermedad COVID-19 con las características clínicas de los pacientes, por lo tanto, evaluar factores de riesgo como la expresión de citocinas inflamatorias y carga viral permitirá diseñar estrategias para evitar complicaciones a lo largo del período de tratamiento de la enfermedad COVID-19.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

COVID-19 es enfermedad respiratoria a nivel mundial responsable del 1% de muertes observadas por eventos de neumonías críticas. Se ha reportado que la presentación grave de la enfermedad está asociada en algunos casos por el desarrollo de una respuesta inflamatoria sistémica caracterizada por la liberación incontrolada de citocinas proinflamatorias originando una tormenta de citocinas relacionada a un mayor deterioro de paciente y mortalidad. En personas con un curso clínico grave de la enfermedad la carga viral es de hasta 60 veces mayor que las que tienen un curso más leve y, además, la excreción viral y por lo tanto la transmisión puede ser más intensa y duradera. Sin embargo, ambos procesos no se han relacionado con la parte clínica de la enfermedad ni se han reportado la correlación existente entre ambos procesos con la gravedad de la enfermedad.

V. JUSTIFICACIÓN

La comprensión de los cambios en la respuesta inmune de los pacientes con SARS-CoV-2 (debido a la alta variabilidad de cada individuo al progreso de la enfermedad COVID-19) mediante la caracterización de la expresión anormal de citocinas y la carga viral en las diferentes fases de la enfermedad, permitirá tener una predicción más precisa de la misma. Adicionalmente, los resultados que deriven de este estudio podrían servir para futuras investigaciones que tengan por objetivo comprender la fisiopatología molecular del COVID-19.

VI. HIPÓTESIS

El incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias y la carga viral durante la infección por SARS-CoV-2 está relacionado con la severidad de la enfermedad, así como con la evolución clínica de los pacientes.

VII. OBJETIVOS

Evaluar la asociación del perfil de expresión de citocinas proinflamatorias en leucocitos de sangre periférica y la carga viral de SARS-CoV-2 en exudado nasofaríngeo con cuantificación relativa y cuantificación absoluta respectivamente por PCR en tiempo real para establecer una correlación con la severidad y la evolución clínica de los pacientes con la presentación de la enfermedad.

Objetivos particulares

- Determinar la carga viral en muestras de exudado nasofaríngeo o expectoración en pacientes positivos a SARS-CoV-2 con diferentes grados de desarrollo de la enfermedad por qPCR.
- Evaluar los niveles de expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α) en la capa leucocitaria en sangre de pacientes positivos a SARS-CoV-2 con diferentes grados de desarrollo de la enfermedad con cuantificación relativa PCR en tiempo real.
- Correlacionar la expresión de citocinas proinflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 con la gravedad de la enfermedad y la evolución clínica de los pacientes.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1. Tipo de estudio

Estudio observacional, prospectivo y longitudinal.

8.2. Población de estudio

Se incluyeron pacientes ingresados a los servicios COVID-19 del Hospital Juárez de México mayores de 18 años y de sexo indistinto, cuya muestra de exudado nasofaríngeo obtuvo un resultado positivo a SARS-CoV-2. Se trabajó con un universo

de datos de aquellos pacientes que ingresaron en el período comprendido del 01 de enero al 30 de mayo del 2021 y que aceptaron participar en el protocolo por medio de su firma en la carta de consentimiento informado con número de registro No. HJM 001/20-1, la cual se les explico detalladamente.

8.3. Criterios de inclusión

- Pacientes con rango de edad mayor a 18 años ingresados en los servicios COVID-19 del HJM con una prueba positiva para SARS-CoV-2 en exudado nasofaríngeo con Ct menor a 23.
- Sexo indistinto.
- Pacientes con CO-RAD mayor a 3.
- Pacientes con/sin comorbilidades preexistentes como diabetes, hipertensión, obesidad, etc.
- Clínica (síntomas y pruebas de laboratorio que correspondan a la enfermedad): fiebre, linfopenia, trombocitopenia, neutrofilia etc.
- Pacientes con la presentación de la enfermedad leve, grave y critica.
- Pacientes con el desarrollo de la enfermedad en un periodo de 1-10 días después del inicio de los síntomas.

8.4. Criterios de exclusión

- Defunción del paciente antes de la segunda toma.
- Pacientes con más de 25 días de desarrollo de la enfermedad.
- Pacientes con prueba positiva con Ct mayor a 25.

8.5. Criterios de eliminación

- Muestras de sangre sin anticoagulante.
- Muestras respiratorias con toma inadecuada (con poca cantidad de células).

8.6. Criterios de Selección del Grupo Control

Se incluyeron pacientes sanos donadores de sangre del Hospital Juárez de México mayores de 18 años y de sexo indistinto, cuya muestra de sangre periférica fue

proporcionada al laboratorio y que aceptaron participar en el protocolo por medio de su firma en la carta de consentimiento informado con número de registro No. HJM 001/20-1, la cual se les explico detalladamente.

Tabla 1. Características físicas y clínicas de los pacientes sanos (Donadores de sangre, de acuerdo al Instituto Mexicano del Seguro Social, 2019 y al Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología, 2021)

GRUPO CONTROL: PACIENTES SANOS
-Edad de 18 a 65 años.
-Peso mayor de 50 kilogramos.
-Ayuno mínimo de cuatro horas (evita consumir alimentos con grasa 24 horas antes de la donación de sangre)
-No haber estado enfermo de gripe, tos, diarrea o infección dental en los últimos 14 días.
-No haber tomado medicamentos en los últimos cinco días.
- No estar embarazada o lactando.
-No haber estado en tratamiento de endodoncia, acupuntura o haberse practicado tatuajes o perforaciones en los últimos 12 meses.
-No haber sido operado en los últimos seis meses.
-No haberse vacunado en los últimos 30 días.
-No haber ingerido bebidas alcohólicas en 72 horas previas a la donación.

8.7. Material biológico

Tipos de muestras

- Sangre periférica con anticoagulante EDTA
- Exudado nasofaríngeo, saliva o expectoración.

La toma 1 se consideró a las muestras obtenidas para el diagnóstico inicial de COVID-19 (exudado nasofaríngeo) y para los estudios hematológicos de rutina: Biometría hemática y Química sanguínea (sangre periférica) que se les realiza a todos los pacientes de nuevo ingreso, y la toma 2 (exudado nasofaríngeo y sangre periférica) se solicitó 5-6 días después de la primera toma para evaluar la evolución de la carga viral y de la expresión de las citocinas pro inflamatorias.

En el caso del Grupo Control de pacientes sanos, se obtuvo una única muestra de sangre periférica al momento en que el Banco de Sangre confirmo que eran candidatos

para donar sangre y cumplían las características antes mencionadas, esto para conocer los valores basales de la expresión de las citocinas estudiadas.

8.8. Reactivos

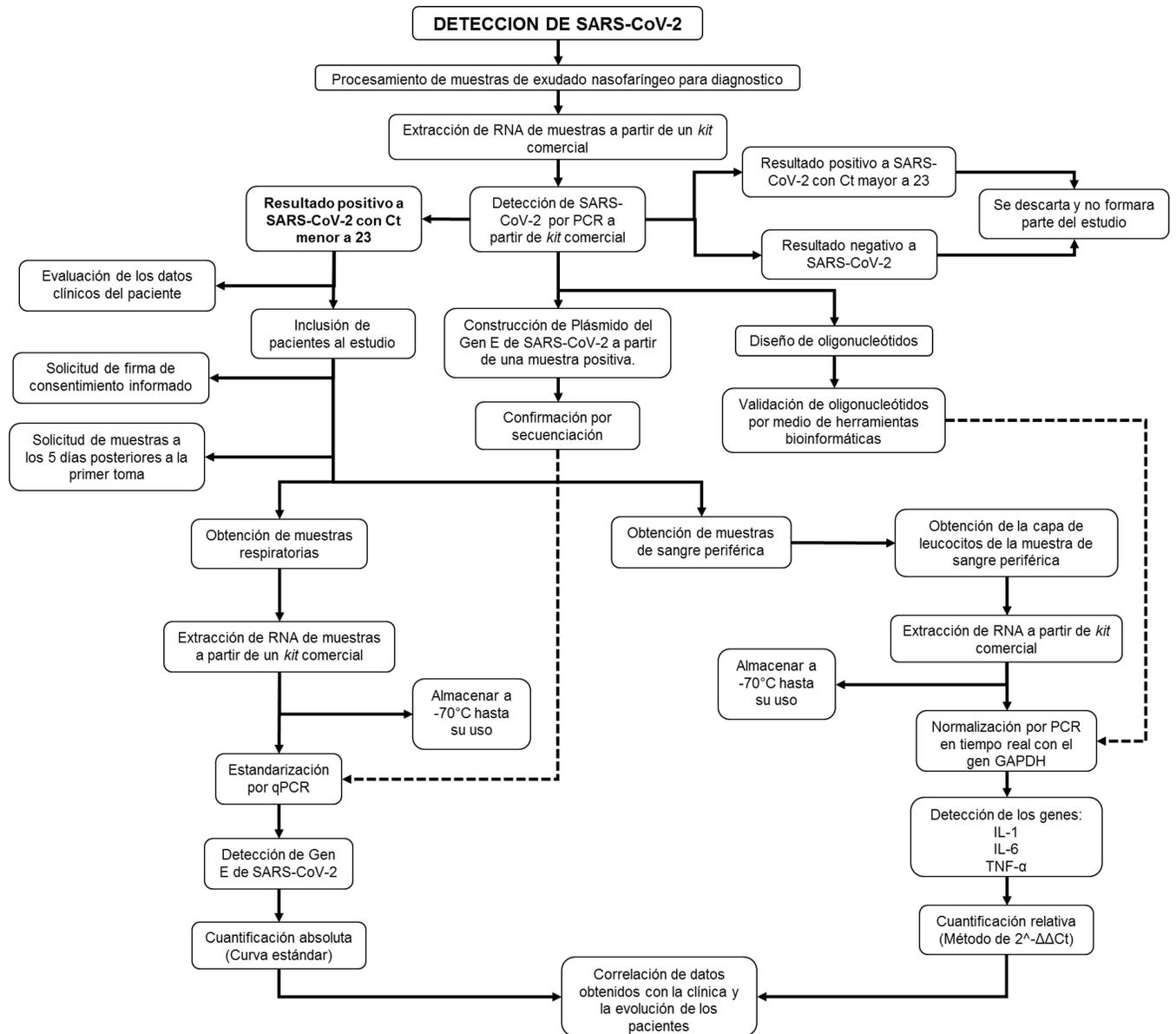
- Luna® Universal One-Step RT-qPCR *Kit* de New England BioLabs® Inc.
- LunaScript® RT SuperMix Kit de New England BioLabs® Inc.
- Luna® Universal Probe qPCR Master Mix de New England BioLabs® Inc.
- Oligonucleótidos sintetizados por T4OLIGO®
- H₂O grado biología molecular marca Lonza
- Kit de Extracción de ARN de QUIAGEN®
- Direct-zol™ RNA Miniprep, TRIzol® In. RNA Out, ZYMO Research
- Buffer de lisis de eritrocitos
- Isopropanol grado biología molecular marca Thermo Scientific™ de Fisher Scientific
- Etanol grado biología molecular marca Thermo Scientific™ de Fisher Scientific
- TRIzol™ Invitrogen™ de Fisher Scientific
- Cloroformo grado biología molecular Invitrogen™ de Fisher Scientific

8.9. Equipos

- Cabina de flujo laminar Nivel II A/B3
- Campana PCR con irradiación UV marca BioSan
- Mini dry bath para tubos de 1.5 mL marca Genetics
- Microcentrifuga con refrigeración mod. 1730R marca GYROZEN
- Espectrofotómetro EPOCH serie 130125D marca BioTekInstrument Inc.
- Mini Vortex V-1 plus marca BioSan
- MS 3 Vortexer marca IKA®
- Mini centrifuga modelo NG002G marca Nippon Genetics Europe
- Mini centrifuga para tira de tubos de qPCR marca DRAGONLAB
- Termociclador para PCR de punto final SEE AMPTM
- Termociclador CFX96™ Real-Time System marca BIO-RAD®

8.10. Métodos

8.10.1. Diagrama de flujo



8.10.2. Diseño y validación de cebadores.

Para el diseño de cada cebador se realizó una búsqueda en bases bioinformáticas como GenBank de NCBI, obteniendo la secuencia FASTA de cada gen para posteriormente diseñar los cebadores en Primer3Plus, de acuerdo a las condiciones requeridas para su validación (T_m , %GC, número de nucleótidos, etc.). Para verificar

dichas condiciones, cada cebador se analizó en la plataforma OligoAnalyzer de IDT. Todos los cebadores cumplieron con las características requeridas.

Tabla 2. Cebadores diseñados en dirección 5´-3´

Gen	Cebador 5´ → 3´
IL-1 β_F	GGACAAGCTGAGGAAGATGC
IL-1 β_S	FAM- TCCCTGCCACAGACCTTCCA -BHQ1
IL-1 β_R	TCGTTATCCCATGTGTGCGAA
IL-6_F	GAAAGCAGCAAAGAGGCACT
IL-6_S	FAM- TGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCCA -BHQ1
IL-6_R	TTTCACCAGGCAAGTCTCCT
TNF_F	CTCTCTCCCCTGGAAAGGAC
TNF_S	FAM- GATCCGGGACGTGGAGCTGG -BHQ1
TNF_R	AAGAGGCTGAGGAACAAGCA
GAPDH_F	CAGCCTCAAGATCATCAGCA
GAPDH_S	FAM- CCCCTGGCCAAGGTCATCCA -BHQ1
GAPDH_R	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA

8.10.3. Extracción de ARN en muestras respiratorias

Una vez que se obtuvieron las muestras respiratorias (exudado nasofaríngeo, saliva o expectoración) se siguió el protocolo de extracción propuesto por el fabricante:

QUIAGEN Protocolo de Extracción de ARN

Se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas modificaciones. En primer lugar, se adicionó 560 µl de Buffer AVL y 5 µl de Acarreador de RNA en un tubo de 1.5 mL y se agregó 140 µL de muestra de exudado nasofaríngeo, saliva o expectoración. Se mezcló y dio vórtex y se dejó incubar a 70°C/10min. Posteriormente se agregó 560 µl de Etanol absoluto frío. Se dio vórtex y Spin y se transvasó a la columna 650 µl de la mezcla (x2) y se centrifugó a 11,000rpm/2min, se cambió de tubo colector en cada pase. Se agregaron 500 µl de AW1 y se centrifugó a 11,000rpm/2min. Se agregaron 500 µl de AW2 y se centrifugó a 14,000rpm/3min. Se eluyó en 35 µl de Buffer AVE y se centrifugó a 11,000rpm/2min. Se etiquetó el tubo y se almacenó la muestra a -20°C hasta su uso.

8.10.4. Obtención de ARN de leucocitos en sangre periférica

Protocolo de Extracción de ARN por Trizol-Cloroformo y Tratamiento con DNAsa

Se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, aproximadamente 1 mL de sangre periférica y se centrifugó a 4,000 rpm/5 min para separar la sangre en plasma, capa blanca (leucocitos) y capa roja (eritrocitos). Se desechó todo el plasma y se tomó solo la capa leucocitaria (blanca), se colocó en un tubo Eppendorf nuevo y se etiquetó. Se adicionó 1 mL de Buffer de Lisis de Eritrocitos. Se dejó incubar 30 min. Se centrifugó a 14,000 rpm/10 min. Posteriormente se eliminó todo el sobrenadante y se dio vortex a la pastilla hasta disolver. Se adicionó 1 mL de Buffer de Lisis de Eritrocitos, se dio vortex y se centrifugó a 14,000 rpm/5 min. Se eliminó todo el sobrenadante y se dio vortex a la pastilla hasta disolver. Se adicionó (dependiendo del tamaño de la pastilla) 800 o 1000 µL de Trizol y se resuspendió varias veces, se adicionó 200 µL de Cloroformo y se resuspendió varias veces y se almacenó a -70°C por 15-30min. Posteriormente se dió vortex hasta que se tornara lechoso y se centrifugó a 14,000 rpm/10 min. Se obtuvo todo el sobrenadante y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con un volumen igual de etanol (95-100%). Se transfirió la mezcla a una Columna IICR Zymo-Spin™ en un tubo colector y se centrifugó a 11,000rpm /2min. Se colocó la columna a un nuevo tubo colector y se desechó el sobrenadante. Se añadió 400 µl de Wash Buffer de ARN a la columna y se centrifugó 11,000rpm /1min. Para el tratamiento con DNAsa, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril se adicionaron 5 µl de DNAsa I y 75 µl de Digestion Buffer de ADN y se mezcló mediante inversión suave. Posteriormente la mezcla se agregó directamente a la matriz de la columna. Se dejó incubar a temperatura ambiente (20-30°C) durante 15 minutos. Una vez pasado el tiempo de incubación se añadió 400 µl de Direct-zol™ RNA PreWash a la columna y se centrifugó 11,000rpm /2min. Se desechó el sobrenadante y se repitió este paso una vez más, posteriormente se añadió 700 µl de Wash Buffer de ARN a la columna y se centrifugó 14,000rpm /2 minutos para asegurar la eliminación completa del Wash Buffer. Finalmente se transfirió la columna con cuidado a un tubo Eppendorf de 1.5 mL estéril. Para eluir el ARN se agregaron 50 µl de agua libre de DNAsa/ARNasa directamente a la matriz de la columna y se centrifugó 11,000rpm/2min. Se almacena la muestra a -20°C hasta su uso.

8.10.5. Detección de SARS-COV-2

Una vez extraídas las muestras de exudado nasofaríngeo de los pacientes, se realizó la detección del virus SARS-CoV-2 por medio del *kit* comercial GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp mediante PCR en tiempo real por amplificación del gen RdRp, gen E y gen N del virus. Dicho *kit* cuenta con una sensibilidad confirmada de 10 copias por reacción para los genes objetivo. Tomando como base la amplificación del Gen E, se seleccionaron los pacientes con un Ct (valor umbral del ciclo: número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia) menor a 23 para ser incluidos en el estudio. Se sabe que el valor de Ct puede indicar el nivel relativo de ARN viral en una muestra (cuanto más bajos sean los valores del Ct reflejarían niveles virales más altos) (Fundación iO, 2020), por lo que, mientras más bajo era el Ct se podía inferir que la carga viral era alta, y esto se confirmaría por medio de la cuantificación absoluta.

La PCR en tiempo real comunica una estimación semicuantitativa de la carga viral. El ciclo umbral de positividad (Ct) se relaciona inversamente con la carga viral. Existe el acuerdo de que un valor Ct >30 corresponde a un proceso infeccioso no contagioso, si bien este valor de Ct se debe valorar de forma conjunta con otras variables, como el tiempo de evolución, el curso clínico y la gravedad del cuadro (Alcántara, *et al.*, 2021)

8.10.6. Cuantificación absoluta: Carga Viral

La cuantificación absoluta se utiliza para determinar cargas virales, la presencia de agentes patógenos y transgénicos. Permite determinar el número exacto de moléculas del ADN o ARN en una muestra. Para llevarla a cabo, se requiere una muestra con una cantidad exacta en ng/μL, μmol/ μL, número de copias o equivalentes genómicos, como estándar absoluto externo (Aguilera *et al.*, s/f). Este estándar puede ser un fragmento del ADN de doble cadena o de cadena sencilla, un ADNc, un producto amplificado por la PCR de la secuencia del ADN de interés clonado en un plásmido, un producto de la PCR convencional o la síntesis directa de la secuencia del ADN blanco (Aguilera *et al.*, s/f). Este estándar externo se usa para hacer diluciones seriadas y generar una curva, a partir de los valores de Ct obtenidos para cada concentración y el logaritmo de la

concentración correspondiente. Esta curva de calibración permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras problema y obtener su concentración (Aguilera *et al.*, s/f). En este caso el estándar externo fue un producto amplificado por PCR del Gen E de SARS-CoV-2 clonado en un plásmido.

8.10.7. Construcción del Plásmido del Gen E

En colaboración con la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI se generó el plásmido que contenía el Gen E de SARS-CoV-2, esto por medio de la clonación del producto de PCR en tiempo real amplificado, a partir del ARN extraído de un paciente positivo a SARS-CoV-2, en el vector pJET1.2 usando CloneJET™ *Kit* de clonación por PCR (Thermo Scientific™). El plásmido se transformó y propago en la cepa E.coli JM109 y se extrajo usando GeneJET Plasmid Miniprep *Kit* (Thermo Scientific™) y se confirmó por Sanger (secuenciación) usando un analizador genético ABI3500xL (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

La concentración de ADN plasmídico se obtuvo por medio de Qubit dsDNA BR assay (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) para mejorar la precisión de la cuantificación. Se convirtió el tamaño del plásmido de ADN en números de copias multiplicando el tamaño del plásmido por la masa promedio de pares de nucleótidos (Mw) (~660 g/mol) y se dividió por la constante de Avogadro: $N_A = 6.022 \times 10^{23}$ moléculas. Los plásmidos se diluyeron en serie a las siguientes concentraciones: 1.0×10^2 , 1.0×10^3 , 1.0×10^4 , 1.0×10^5 , and 1.0×10^6 copias/reacción. El número de copias de cada control se obtuvo usando diluciones seriadas (de 10 a 10^6 copias/ μ L) de plásmido con cada dilución por triplicado. Se realizó una regresión lineal entre el valor umbral del ciclo (valor Ct) y el Log₁₀ del número de copias.

La eficiencia de amplificación para cada reacción de fusión se calculó mediante la ecuación: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ y convertido a E% con $(E - 1) \times 100$. Se obtuvo una E% de 97.93% como se puede ver en el gráfico 1.

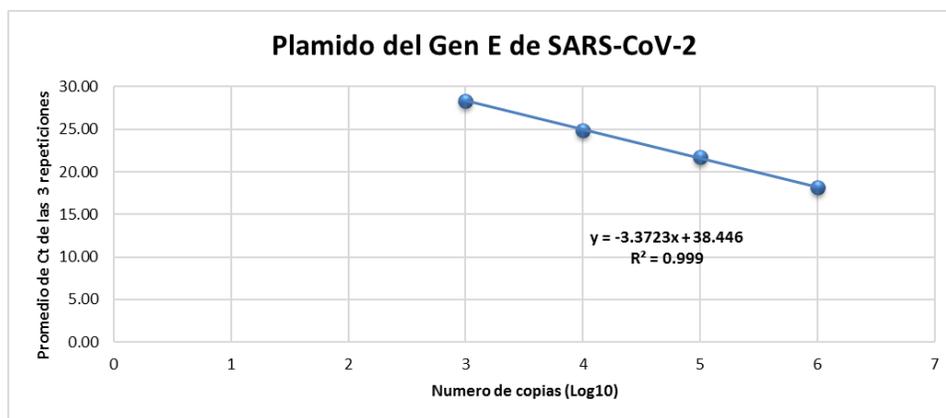


Gráfico 1. Regresión lineal entre el valor umbral del ciclo (valor Ct) promedio de las repeticiones realizadas con el plásmido diseñado y el Log10 del número de copias obtenidas.

8.10.8. Condiciones de PCR en tiempo real para la Cuantificación de la Carga Viral

Para la realización de la cuantificación de la carga viral en las muestras de Toma 1 y Toma 2 se realizaron modificaciones al Protocolo de Berlín para la detección del Gen E. Por cada corrida de muestras que se incluían se realizaba una curva estándar para interpolar los valores. En la máster mix de las muestras se ocupó 5 µL de la misma y en la master mix de la curva se ocupó 1 µL de cada punto, ya que se consideró que por cada µL de la dilución había cierto número de copias, por ejemplo, en el punto 1, que es el stock había 1,000,000 de copias/µL por lo que, al aumentar la cantidad, se estaría perdiendo el valor real y no se podría distinguir el comportamiento real de la curva estándar.

Tabla 3. Cantidades de reactivos utilizados para PCR de tiempo real de las muestras de ARN de exudado nasofaríngeo.

Reactivo	Cantidad
Enzima One Step Luna®	1 µL
Buffer Luna®	10 µL
Primer Forward Gen E	1 µL
Primer Reverse Gen E	1 µL
Sonda Gen E	0.5 µL
Agua libre de RNAsas	1.5 µL
RNA muestra	5 µL
Total	15 µL

Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizados para PCR de tiempo real de la curva estándar.

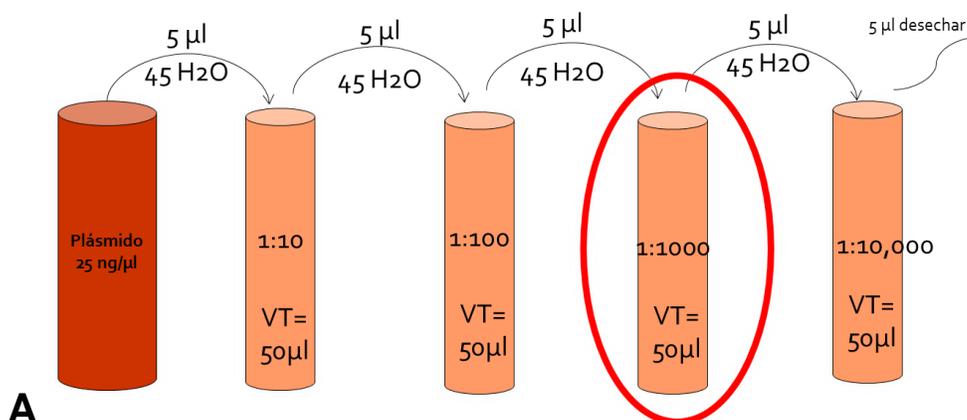
Reactivo	Cantidad
Enzima One Step Luna®	1 µL
Buffer Luna®	10 µL
Primer Forward Gen E	1 µL
Primer Reverse Gen E	1 µL
Sonda Gen E	0.5 µL
Agua libre de RNAsas	1.5 µL
Punto de la curva (diluciones)	1 µL
Total	15 µL

Tabla 5. Condiciones de PCR en tiempo real para el gen E y la curva estándar (Protocolo de Berlín modificado).

4 ciclos	55°C por 10 minutos
	95°C por 1 minuto
	95°C por 10 segundos
	60°C por 30 segundos

8.10.9. Estandarización: Curva de calibración

La concentración final del plásmido fue de 25 ng/µL, para lograr que en un microlitro hubiera 1,000,000 de copias se realizaron diluciones seriadas 1:10 del plásmido, como se observa en la figura 7A. De la dilución 1:1000 cuya concentración era de 2.5E-11 se ocuparon 13.4 µL con 86.5 µL de agua para tener en 1 µL 1,000, 000 de copias del plásmido (Stock).



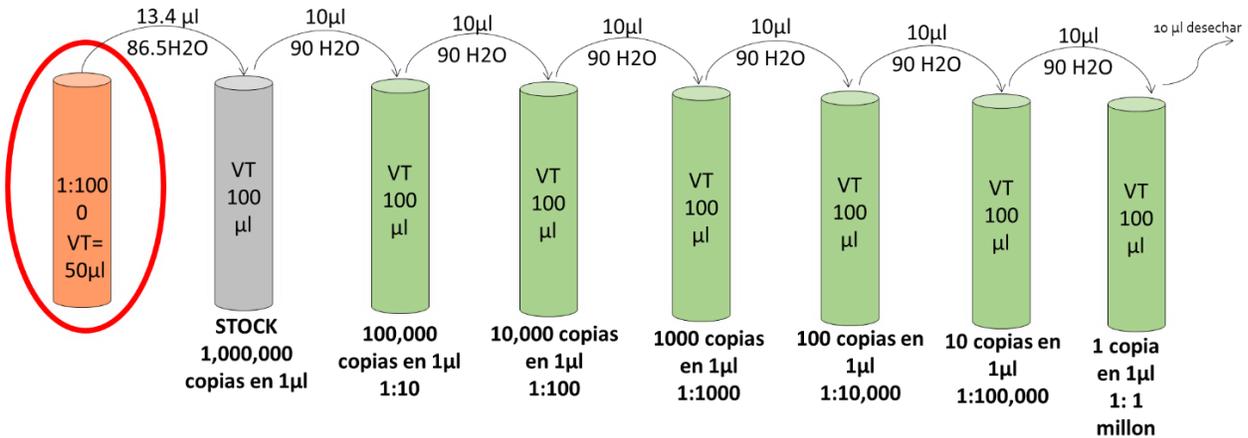
B

Figura. 7 A y B Diluciones realizadas para la obtención de la curva estándar a partir del plásmido diseñado del Gen E.

Una vez obtenido el Stock se realizaron diluciones seriadas de 1:10 para obtener la curva de estándar, cada dilución formaría parte de un punto de la curva con una concentración diferente, desde 1 millón hasta 10 copias por microlitro (Figura 7B) siendo este último el límite de detección, el cual se obtuvo realizando por quintuplicado la curva estándar.

Para determinar el porcentaje de aumento o disminución de la carga viral se realizaron los caculos de porcentaje de aumento o disminución con dos métodos diferentes:

DISMINUCIÓN	AUMENTO
Por diferencias y división:	Por logaritmos y potencias:
1. Resta de Toma 1 -Toma 2	1. Resta: LOG10(Toma 1) - LOG10(Toma 2)
2. División: Diferencia/ Valor inicial	2. Calculo: 1 – POTENCIA (10, resultado de paso 1)

8.10.10. Cuantificación relativa: Expresión de citocinas

La cuantificación relativa se utiliza en ensayos de expresión génica, principalmente. Se parte de los niveles del transcrito o ARNm de las muestras, por lo que es necesario realizar la transcripción reversa (RT) y los ensayos se conocen como RT-PCR en tiempo real (Aguilera, s/f). Este tipo de cuantificación mide los cambios en el estado basal de un gen de interés versus un gen de expresión constante que actúa como control.

La diferencia con la cuantificación absoluta radica en que no se parte de una cantidad conocida del ADN, sino de un control endógeno o gen constitutivo (Aguilera, s/f). Debido a que no se conoce la cantidad absoluta del estándar interno, sólo se pueden determinar los cambios relativos del gen de interés con referencia al gen endógeno (Aguilera, s/f).

8.10.11. Grupo Control

Para poder determinar la expresión normal de las citocinas en pacientes sanos se realizó el mismo procesamiento de la sangre del grupo control que en los pacientes con COVID-19 realizando la PCR de cada muestra por triplicado. Los valores de expresión del grupo control servirían para la determinación del valor normal de la expresión de citocinas en pacientes sanos para poder compararlos con la expresión de las citocinas en pacientes que presentan la enfermedad por SARS-CoV-2.

El grupo control fue conformado por 60 personas, de los cuales se tomaron 22 de ellas con de sexo y edad similares a las de los pacientes de este estudio para determinar la expresión de las citocinas de forma pareada.

8.10.12. Condiciones para la preparación de cDNA

Para optimizar las extracciones de ARN obtenidas a partir de los leucocitos de sangre periférica, se realizó la síntesis de cDNA en un flujo de trabajo RT-qPCR de dos pasos por medio de kit comercial (LunaScript® RT SuperMix). La transcripción inversa (RT) es un proceso por el que a partir de una hebra de ARN se genera una cadena complementaria de ADN (cDNA) por medio de la enzima transcriptasa reversa (Checa, 2018) para ser utilizado como molde para la PCR en tiempo real.

Tabla 6. Cantidades de reactivos utilizados para síntesis de cDNA a partir de las muestras de ARN de leucocitos de sangre periférica.

Reactivo	Cantidad
RT SuperMix LunaScript ®	4 µL
Agua libre de RNAsas	15.4 µL
ARN muestra	0.6 µL
Total	20 µL

La mezcla final (20 µL) se procesó en un termociclador de punto final con las siguientes condiciones para la síntesis del cDNA:

Tabla 7. Condiciones de termociclador de punto final para síntesis de cDNA.

Temperatura	Tiempo
25°	2min
55°C	10min
95°C	1min
4°C	Forever

8.10.13. Condiciones de PCR en tiempo real para la Cuantificación Relativa

Una vez sintetizado el cDNA se realizó el segundo paso para la PCR en tiempo real utilizando un kit comercial y los cebadores diseñados para cada gen de interés o gen endógeno según fue el caso:

Tabla 8. Cantidades de reactivos utilizados para síntesis de cDNA a partir de las muestras de ARN de leucocitos de sangre periférica.

Reactivo	Cantidad
Universal Probe qPCR Master Mix	5 µL
Agua libre de RNAsas	2 µL
Cebador Forward	0.8 µL
Cebador Reverse	0.8 µL
Sonda	0.4 µL
cDNA	1 µL
Total	10 µL

Tabla 9. Condiciones de PCR en tiempo real para la cuantificación relativa de las citocinas

4 ciclos	55°C por 10 minutos
	95°C por 1 minuto
	95°C por 10 segundos
	60°C por 30 segundos

8.10.14. Normalización con el gen GAPDH

Es necesario normalizar los datos entre el valor que se obtiene para el gen de interés y el del gen endógeno, de tal manera que los valores resultantes sean reflejo de los cambios de expresión del gen y no de las diferencias en la cantidad de muestra añadida. Para normalizar la expresión génica, a partir de ensayos de cuantificación relativa, existen algunos métodos y modelos que consideran la eficiencia de la amplificación para determinar la cantidad del ADN, por ejemplo, el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Aguilera, s/f).

Generalmente, el gen endógeno (control) es un gen que de manera ideal debe expresarse constante e independientemente de las condiciones experimentales, del tratamiento de las muestras, así como en los diferentes tejidos o tipos celulares. (Aguilera, s/f). Los genes de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y de la β -actina son los más usados como genes endógenos, el que se utilizó para este trabajo fue el GAPDH (el producto de este gen cataliza un importante paso energético en el metabolismo de los carbohidratos, la fosforilación oxidativa reversible de gliceraldehído-3-fosfato en presencia de fosfato inorgánico y dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) NCBI, 2021). Sin embargo, gracias a la sensibilidad de la PCR en tiempo real, se ha observado que, en realidad, algunos procesos biológicos o el uso de diferentes tipos celulares afectan su expresión. Por lo tanto, es necesario validar la estabilidad de la expresión del gen control en las condiciones de un experimento a realizar antes de usarlo para llevar a cabo la normalización (Aguilera, s/f).

Es por ello que para determinar si la expresión del GAPDH se ve modificado por la enfermedad COVID-19 se realizó la normalización por medio del método comparativo de Ct en cada uno de los grupos de estudio (tanto en la toma 1 como en la toma 2, figura 8 y 9 respectivamente) incluido el Grupo control.

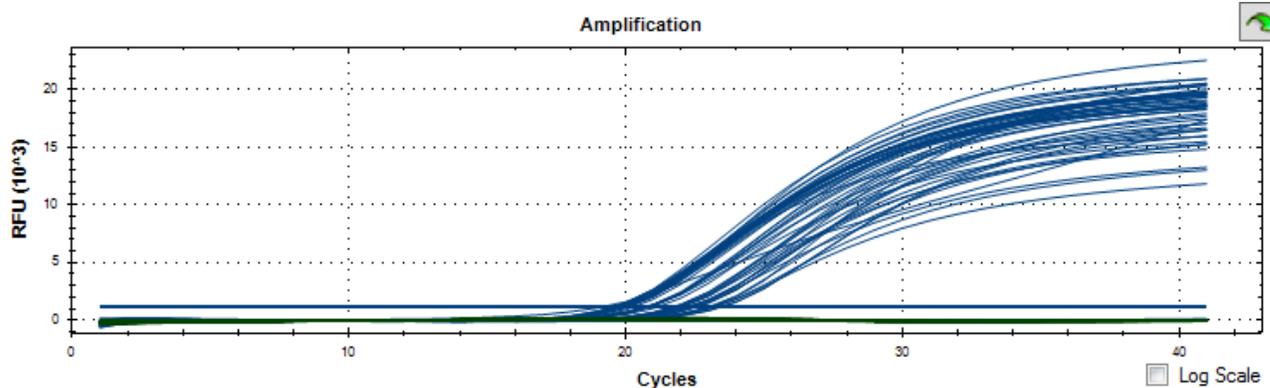


Figura. 8 GAPDH en muestras de pacientes con COVID-19 Toma 1 por PCR en tiempo real

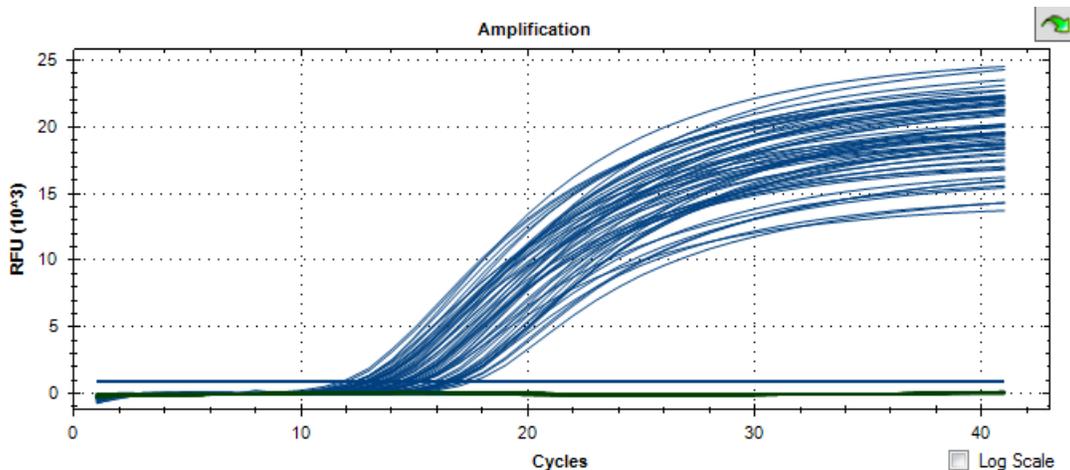


Figura. 9 GAPDH en muestras de pacientes con COVID-19 Toma 2 por PCR en tiempo real

La expresión del GAPDH en cada uno de los grupos fue cercana a la unidad como se puede observar en el gráfico 2, esto indica que en ninguno de los grupos de estudio (con la enfermedad COVID-19 en diferentes grados de gravedad y sin la enfermedad) se ve alterada la expresión del GAPDH, es por esto que se decidió usar como control endógeno, es decir, se logró demostrar que realmente no se ve modificado bajo las condiciones de esta patología (COVID-19).

Expresión de GAPDH en los grupos de estudio

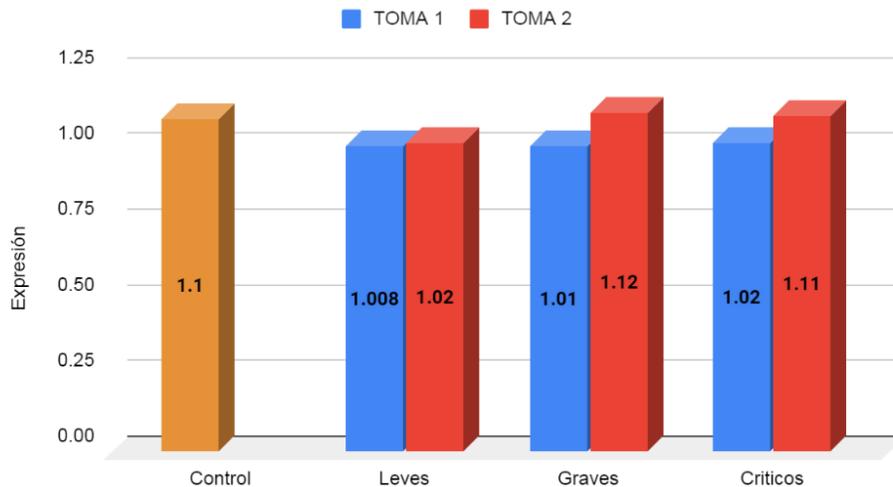


Gráfico 2. Expresión relativa del Gen GAPDH en el grupo control de pacientes sanos y en los grupos de pacientes con COVID-19. Los valores cercanos a la unidad indican que la expresión del gen es normal y no se ve alterada por la presencia de la infección por SARS-CoV-2

8.10.15. Expresión de citocinas inflamatorias IL-1, IL-6 y TNF α

Una vez que se comprobó que el gen endógeno de elección (GAPDH) no se veía alterado por la enfermedad COVID-19 y para conocer la expresión relativa de las citocinas proinflamatorias estudiadas, se realizó la normalización por medio del Método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Este método es un modelo matemático que calcula los cambios de expresión génica como un cambio relativo en ésta (número de veces) entre una muestra experimental o gen de interés y un calibrador o gen endógeno (Aguilera, s/f). Se determinó la expresión relativa en los grupos de estudio incluido el Grupo control. El grupo control se consideró como los niveles normales de expresión con valores cercanos a 1.

8.11. Análisis estadístico

Se hizo una prueba t de student ($n < 30$) para determinar las diferencias significativas entre la expresión de las citocinas en la toma 1 con respecto a la expresión de las citocinas en la toma 2, así como en el promedio de la carga viral de la toma 2 y de la toma 2 en cada uno de los grupos de estudio. Se realizó ANOVA con la finalidad de calcular el valor de p (probabilidad) para determinar si existe una variación significativa entre los valores obtenidos mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para los distintos genes

estudiados en las distintas tomas. Se ocuparon Intervalos de Confianza de 95% y un alfa de 0.05, así mismo se consideraron resultados significativos si el valor de p fue menor a 0.05.

IX. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Se realizó una búsqueda en bases bioinformáticas como GenBank de NCBI, obteniendo la secuencia FASTA de cada gen (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) para posteriormente diseñar los cebadores en la plataforma Primer3Plus, de acuerdo con las condiciones requeridas para su validación (T_m, %GC, número de nucleótidos, etc.). Se realizó el análisis de los cebadores diseñados de las citocinas proinflamatorias y del gen GAPDH por medio de herramientas bioinformáticas como OligoAnalyzer de IDT y se corroboró que cumplían con las características requeridas para trabajar con los mismos. A continuación, se presenta el análisis del gen de IL-6 como ejemplo. Este procedimiento se realizó para las 3 citocinas evaluadas y para el gen endógeno (GAPDH)

Para corroborar que los cebadores diseñados se unen a la secuencia del gen, se realizó un alineamiento con la Secuencia FASTA del gen obtenida de GenBank:

>NM_000600.5 Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA

```
ATTCTGCCCTCGAGCCCACCGGGAACGAAAGAGAAGCTCTATCTCCCCTCCAGGA
GCCAGCTATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTG
GGGCTGCTCCTGGTGTTCCTGCTGCCTTCCCTGCCCCAGTACCCCCAGGAGAAG
ATTCAAAGATGTAGCCGCCACACAGACAGCCACTCACCTCTTCAGAACGAATT
GACAAACAATTTCGGTACATCCTCGACGGCATCTCAGCCCTGAGAAAGGAGACAT
GTAACAAGAGTAACATGTGTGAAAGCAGCAAAGAGGCACTGGCAGAAAACAACCT
GAACCTTCAAAGATGGCTGAAAAGATGGATGCTTCCAATCTGGATTCAATGAGG
AGACTTGCCTGGTGAAAATCATCACTGGTCTTTTGGAGTTTGAGGTATACCTAGAG
TACCTCCAGAACAGATTTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCAGAGCTGTGCAGATGA
GTACAAAAGTCTGATCCAGTTCCTGCAGAAAAGGCAAAGAATCTAGATGCAATA
ACCACCCCTGACCCAACCAAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCTGCAGGCACAGA
ACCAGTGGCTGCAGGACATGACAACTCATCTCATTCTGCGCAGCTTTAAGGAGTTC
CTGCAGTCCAGCCTGAGGGCTCTTCGGCAAATGTAGCATGGGCACCTCAGATTGT
TGTTGTTAATGGGCATTCTTCTTCTGGTCAGAAACCTGTCCACTGGGCACAGAAC
TTATGTTGTTCTCTATGGAGAACTAAAAGTATGAGCGTTAGGACACTATTTTAATTAT
```

El tamaño del amplicón fue de 108 pb, típicamente, de acuerdo con Tamay de Dios *et al.* (2013) los cebadores deben ser diseñados especialmente para garantizar una alta especificidad y para que generen amplicones de un tamaño que oscile entre 100-150 pb; si éstos son más grandes, la eficiencia de la reacción disminuye considerablemente, además, pueden dar como resultado curvas de fusión con formatos extraños o incluso picos dobles, ya que la fusión del amplicón largo puede no ocurrir a la misma temperatura y los amplicones más cortos (<70 pb) pueden dar como resultado señales de fluorescencia más débiles. De acuerdo con lo anterior, el tamaño del amplicon (108 pb) es adecuado y cumple con la característica requerida.

Para verificar que las condiciones de los oligonucleótidos son las correctas se realizó su análisis en la plataforma de OligoAnalyzer en la cual se permite conocer los valores de T_m, %GC así como la longitud y otras características que indican su estabilidad (Harpin) y la formación de dímeros (self-dimer):

Se sabe que los cebadores son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. El análisis del cebador Forward (5'-GAAAGCAGCAAAGAGGCACT-3') inicial arrojó que la T_m es de 56°C y el %GC es del 50% y su longitud fue de 20 pb. El análisis del cebador Reverse (5'-TTTACCAGGCAAGTCTCCT- 3') indico que la T_m es de 56.3°C y el %GC es del 50% y su longitud fue de 20 pb. Estos valores son aceptables ya que, de acuerdo con Tamay de Dios *et al.* (2013), para que un cebador sea ideal su T_m (temperatura de fusión) no debe de pasar de 60° C (50-60°C), y que el porcentaje GC debe estar entre el 40-60%, generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases. Estos datos al compararlos entre sí nos indican que las T_m (56°C de Forward y 56.3°C del reverse) difieren en 0.3°C lo cual es aceptable ya que, de acuerdo con De La Fuente, et al. (2018) entre los dos oligonucleótidos la T_m no debe de variar más de 2°C ya que deben tener T_m cercanos.

La sonda (5'-TGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCCA-3') es una secuencia de ADN o ARN de cadena simple que se utiliza para encontrar su secuencia complementaria en el genoma de una muestra. La sonda se coloca en contacto con la muestra bajo

condiciones que permitan que la secuencia de la sonda se hibride con su secuencia complementaria. La sonda está marcada con un marcador radiactivo o químico que permite visualizarla (Aguilera,s/f). Las sondas deben tener una Tm 6–8 ° C más alta que los cebadores. Si la temperatura de fusión es demasiado baja, el porcentaje de sonda unida al objetivo será bajo. En este caso, los cebadores pueden amplificar un producto, pero la sensibilidad puede verse comprometida ya que todos los sitios diana no están saturados con la sonda, lo que da como resultado una señal de fluorescencia reducida que no representa realmente la cantidad real de diana presente en la muestra (Aguilera,s/f). Las Tm fueron de 56°C de Forward y 56.3°C del reverse y la Tm de la sonda es de 59.1°C, es decir, es más alta que la de los primers (por 3.1°C y 2.8°C respectivamente), lo que indica que la Tm del Forward primer está muy cercano a la Tm de la sonda y la Tm del Reverse apenas es aceptable. En cuanto al contenido de %GC al igual que con las secuencias de cebadores, deberá tener un contenido de GC de 35-65% y evitar una G en el extremo 5' para evitar la extinción del fluoróforo 5'. En este caso el %GC de la sonda fue de 44%, lo cual es aceptable.

Este análisis se realizó con cada par de cebadores diseñados y los resultados se pueden observar en la tabla 10. Todos cumplieron con las características requeridas.

Tabla 10. Características de los Oligonucleótidos analizados.

Gen	Cebador 5'→ 3'	Longitud pb	Tm °C	%GC
IL-1 β_F	GGACAAGCTGAGGAAGATGC	20	55.9 °C	55 %
IL-1 β_S	FAM- TCCCTGCCCACAGACCTTCCA -BHQ1	21	63 °C	61.9 %
IL-1 β_R	TCGTTATCCCATGTGTGCGAA	20	53.6 °C	45 %
IL-6_F	GAAAGCAGCAAAGAGGCACT	20	56 °C	50 %
IL-6_S	FAM- TGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCCA -BHQ1	25	59.1 °C	44 %
IL-6_R	TTTACCAGGCAAGTCTCCT	20	56.3 °C	50 %
TNF_F	CTCTCTCCCCTGGAAAGGAC	20	56.7 °C	60 %
TNF_S	FAM- GATCCGGGACGTGGAGCTGG -BHQ1	20	62.6 °C	70 %
TNF_R	AAGAGGCTGAGGAACAAGCA	20	56.5 °C	50 %
GAPDH_F	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	20	54.8 °C	50 %
GAPDH_S	FAM- CCCCTGGCCAAGGTCATCCA -BHQ1	20	62.2 °C	65%
GAPDH_R	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA	20	55.7 °C	50 %

Características demográficas de los pacientes con COVID-19

Según estimaciones generales, y específicas por edad y sexo del Estudio Nacional de sero-Epidemiología de la Infección por SARS-CoV-2 (ENECOVID, 2020) el riesgo de muerte por infección por SARS-CoV-2 fue mayor en hombres que en mujeres y aumentó con la edad, sobre todo a partir de los 50 años, hasta alcanzar un 11.6-16.4 % en hombres de 80 años o más y un 4.6-6.5 % en mujeres de 80 años o más. Los adultos de cualquier edad con comorbilidad asociada tienen un mayor riesgo de contraer una enfermedad grave por el virus del SARS-CoV-2, o un aumento del riesgo, esto de acuerdo con Alcántara, *et al.* (2021). En este caso los rangos de edades observados en los pacientes con COVID-19 de este estudio variaron desde 37-90 años, como se muestra en el gráfico 3.

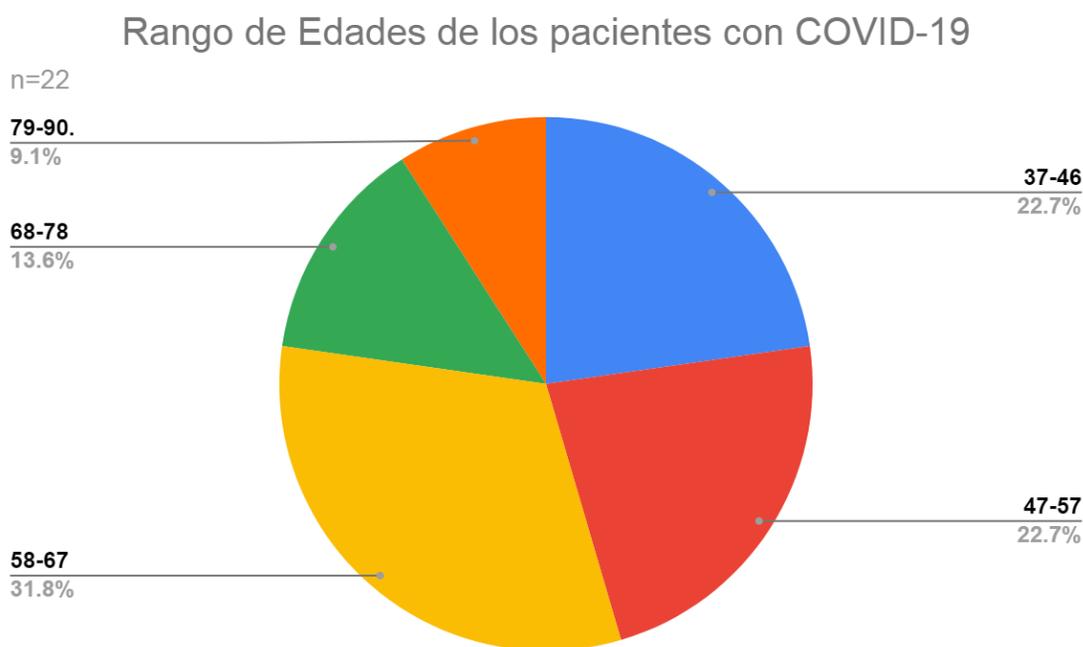


Gráfico 3. Rango de edades de los pacientes con COVID-19. La mayoría de los pacientes fueron mayores de 37 años y con un máximo de edad de 90 años. El rango de edad con mayor porcentaje fue de 58-67 años (31.8%).

En cada grupo de estudio las edades promedio fueron variadas: en el grupo de pacientes leves-moderados el promedio de edad fue de 48 (± 5.5) años, en el grupo de los pacientes graves el promedio fue de 59 (± 14.1) años y en el grupo de pacientes críticos el promedio fue de 63 (± 13.9) años como se observa en el gráfico 4. De

acuerdo con la CDC (2021) los adultos mayores corren mayor riesgo de enfermarse gravemente por COVID-19, es decir, tienen una mayor probabilidad de ser hospitalizados, de requerir cuidados intensivos o un respirador mecánico e incluso un mayor riesgo de muerte; dicho riesgo aumenta para las personas a partir de los 50 años y sigue aumentando a partir de los 60, 70 y 80, tal como se observó en este caso. Las personas de 85 años o más son las que mayor probabilidad tienen de padecer la enfermedad crítica.

Como se puede observar en la gráfica 4, efectivamente, dependiendo de la edad, la gravedad de la enfermedad va aumentando, lo que conlleva a que, a mayor edad, mayor es el riesgo de presentar la enfermedad en su forma más crítica, esto se debe principalmente a una inmunidad disminuida y a una mayor prevalencia de enfermedades crónicas en la población adulta como se dijo anteriormente.

EDAD PROMEDIO

Edad en relación con la gravedad de la enfermedad

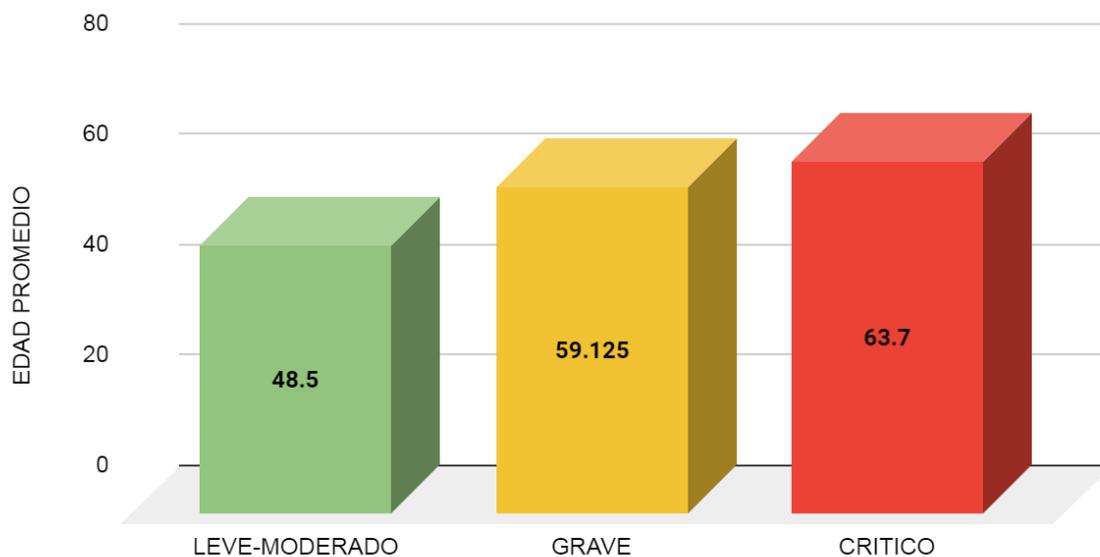


Gráfico 4. Edad promedio de cada grupo de estudio con diferente grado de gravedad de la enfermedad COVID-19. Al clasificar a los pacientes, el promedio de edades de cada grupo parece aumentar conforme la gravedad. La edad promedio de los pacientes con COVID-19 leve-moderado fue de 48.5 años y en comparación con el grupo de COVID-19 crítico que fue 63.7 años.

Se ha visto que el sexo es un factor importante en la heterogeneidad de la mortalidad por COVID-19, ya que en diversos estudios existen significativas diferencias en función del sexo, teniendo los hombres un mayor riesgo en comparación con las mujeres según Cañelles, *et al.*, (2021). La proporción de hombres y mujeres (50%-50% respectivamente) en este estudio fue similar tanto en el grupo de pacientes leves-moderados como en el grupo de pacientes graves, en el grupo de pacientes críticos hubo un mayor porcentaje de hombres (60%) que de mujeres (40%), como se puede observar (gráficas 5 y 6). Es así como la asociación de un cuadro más crítico de COVID-19 con la edad avanzada y con el hecho de ser hombre retoma su importancia en este trabajo.



Gráfico 5. Sexo en relación con la gravedad de la enfermedad. **A.** Grupo Leve-moderado y **B.** Grupo grave. En ambos casos la afectación de la enfermedad COVID-19 fue la misma tanto para hombres como para mujeres.



Gráfico 6. Sexo en relación con la gravedad de la enfermedad. Grupo con COVID-19 crítico, existe un mayor porcentaje de hombres (60%) que de mujeres (40%).

Clasificación de los pacientes con COVID-19

En este estudio se realizó el seguimiento de 22 pacientes con COVID-19 confirmado, cada uno de los pacientes cumplió con las características descritas por la OMS (2020) en cuanto al grado de gravedad de la enfermedad, por lo que fueron clasificados como Leves-Moderados, Graves y Críticos de acuerdo con su evolución, a sus características clínicas y basado en la clasificación realizada por la OMS (2020) y a Sosa *et al.* (2020). El total de pacientes con COVID-19 leve-moderado fue de 4/22 (18.2%), el grupo de pacientes graves fue de 8/22 (36.4%) y el de pacientes críticos fue de 10/22 (45.5%), como se puede observar en el gráfico 7.

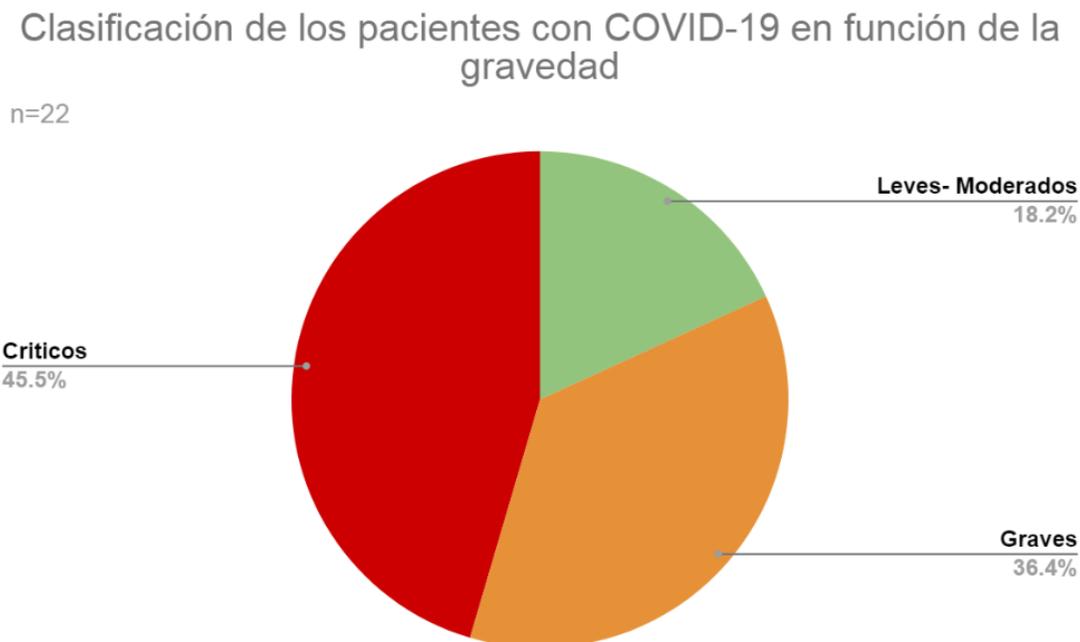


Gráfico 7. Clasificación de los pacientes con COVID-19 en función de la gravedad. Del total de pacientes del estudio, la mayoría (45.5%) fueron pacientes con COVID-19 crítico y un 36.4% pacientes graves y solo un 18.2% fueron pacientes leves-moderados que superaron la enfermedad.

Tanto los pacientes leves-moderados y graves se recuperaron de la enfermedad COVID-19, la diferencia se centró en el tiempo en que se logró la recuperación, los graves tardaron mayor tiempo internados con cuidados intensivos y con requerimiento de ventilación mecánica y los leves requirieron únicamente el uso de puntas nasales de alto flujo, caso contrario al grupo de pacientes críticos, en el que, desafortunadamente, el desenlace fue fatal como se puede observar en la tabla 11.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad

LEVES-MODERADOS	GRAVES	CRITICOS
<ul style="list-style-type: none"> - Sobreviviente (dado de alta) -Comorbilidades preexistentes o sin comorbilidades - Síntomas mínimos (tos, fiebre, cefalea, disnea) y mínima dificultad respiratoria o sin signos de neumonía grave -Internado con puntas nasales de alto flujo o uso de oxígeno -CO-RAD mayor a 3 -Parámetros sanguíneos normales o ligeramente elevados (Neutrofilia, VSG, Ferritina, PCR) o disminuidos (trombocitopenia, linfopenia) 	<ul style="list-style-type: none"> - Sobreviviente (dado de alta) - Comorbilidades preexistentes (diabetes, hipertensión, obesidad etc.) - Además de los síntomas típicos presenta mialgias, artralgias y dificultad respiratoria y neumonía. -Internado con necesidad de ventilador mecánico o puntas nasales de alto flujo -CO-RAD de 5 -Parámetros sanguíneos alterados: Neutrofilia, trombocitopenia, linfopenia, VSG elevada, Ferritina elevada, PCR elevada 	<ul style="list-style-type: none"> - Finado - Comorbilidades preexistentes (diabetes, hipertensión, obesidad etc.) - Signos clínicos de neumonía con aparición de nuevos síntomas respiratorios o empeoramiento de los existentes. - Internado con necesidad de ventilador mecánico - CO-RAD de 5 -Parámetros sanguíneos alterados: Neutrofilia, trombocitopenia, linfopenia, VSG elevada, Ferritina elevada, PCR elevada

Hasta el momento, de acuerdo con la OMS (2020), se ha visto que la mayoría de las personas que presentan COVID-19 solo padecen el tipo leve (el 40%) o moderado (el 40%) de la enfermedad, aproximadamente el 15% presenta un tipo grave de enfermedad para el que se requiere oxigenoterapia, y el 5% son enfermos en estado crítico que presentan complicaciones tales como insuficiencia respiratoria, SDRA y choque séptico, etc. Aparentemente solo pocos pacientes evolucionan a un evento crítico (sumando la presencia de comorbilidades o complicaciones que se van presentando) y una gran mayoría de los pacientes logra sobrellevar la enfermedad sin complicaciones. Sin embargo, la mayoría de las personas que padecen COVID-19 llegan a los servicios de urgencias con una evolución avanzada de la enfermedad o cuando su dificultad para respirar es alta, es así como, la oportunidad de captar a pacientes con síntomas leves o con la enfermedad moderada en este estudio fue mínima.

Evolución de los pacientes con COVID-19

La evolución de los pacientes con COVID-19 en este estudio tuvo un desarrollo favorable en el 54.5% (12/22) de los casos, en cambio, en el 45.5% (10/22) de los casos restantes el desenlace fue fatal (grafico 8), por lo que se puede decir que efectivamente la mayoría de los casos sobrellevan la enfermedad y logran sobrevivir ya que según lo reportado por la OMS (2021) cerca del 80% de los pacientes que

padecen la enfermedad logran sobrevivir, a pesar de ello, el porcentaje de fallecimientos no fue tan bajo en este estudio como lo reportado por la OMS.

Evolución de los pacientes con COVID-19

n= 22

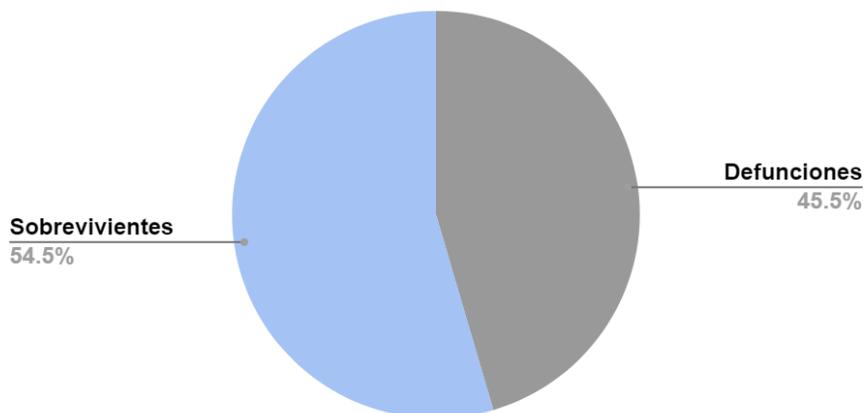


Gráfico 8. Evolución de los pacientes con COVID-19. El 54.5% del total de los pacientes sobrevivió y un 45.5% falleció por complicaciones generadas por el virus SARS-CoV-2.

Todos los casos de defunción formaron parte del grupo de COVID-19 crítico; la evolución en promedio fue de 18 (± 7) días (desde el inicio de síntomas hasta el día de defunción), lo que coincide con lo reportado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias (2020) quien indica que el tiempo entre el inicio de síntomas hasta la instauración de síntomas graves como la hipoxemia es de 1 semana, y de 2-8 semanas hasta que se produce el fallecimiento, por lo que la evolución de los pacientes es crítica en la semana 2 después del inicio de síntomas, ya que se determinará si el paciente tiende a la recuperación o su evolución será desfavorable, de acuerdo a la OMS. Es importante destacar que la primera toma de muestra de exudado nasofaríngeo que se realizó en los pacientes para el diagnóstico de SARS-CoV-2 por PCR en tiempo real, en promedio, fue de 7 días después del inicio de los síntomas y la segunda toma se realizó, en promedio, 12 días después del inicio de síntomas, teniendo una diferencia entre tomas de 5 días. Las muestras de sangre periférica se recabaron el mismo día de las tomas de exudado nasofaríngeo. Este rango de días se decidió de acuerdo con lo reportado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020), indican que el tiempo medio desde el inicio de los síntomas hasta la recuperación es de

2 semanas cuando la enfermedad ha sido leve y 3-6 semanas cuando ha sido grave o crítica.

Dentro del grupo de COVID-19 crítico, en el que todos fallecieron, se observó un mayor porcentaje de pacientes del sexo masculino (60%). Cañelles, *et al.* (2021) han reportado que los hombres tienen un mayor riesgo de complicación por COVID-19 en comparación con las mujeres como se puede observar en el gráfico 9.

Defunciones en función del sexo

Total de Defunciones: 10

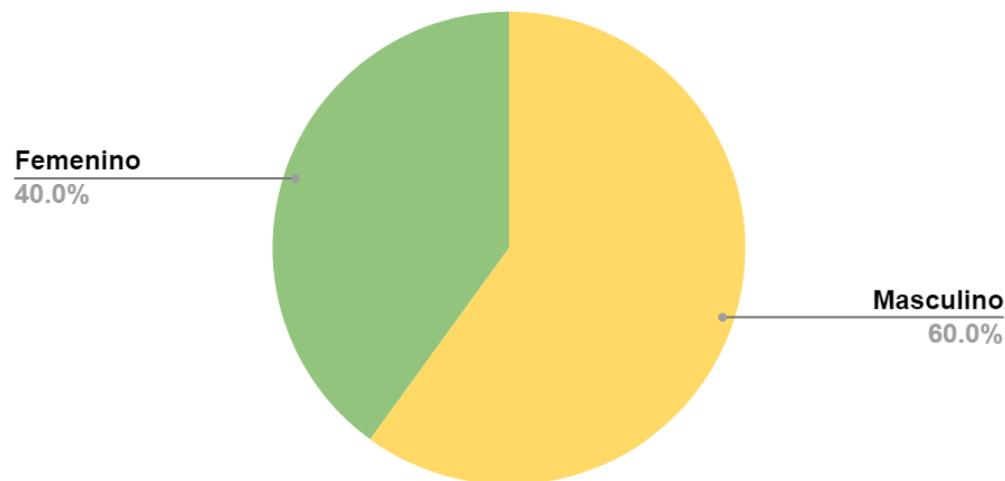


Gráfico 9. Defunciones en función del sexo en los pacientes con COVID-19 crítico. En el grupo de pacientes con COVID-19 crítico fue donde se observaron todas las defunciones, teniendo un mayor porcentaje en pacientes hombres (60%) que en pacientes mujeres (40%)

Hallazgos tomográficos en pacientes con COVID-19 (CO-RADS)

En cuanto a los hallazgos tomográficos reportados de acuerdo con la escala de CO-RADS propuesta por Elizalde, *et al.* (2020), todos los pacientes de este estudio (con diferentes grados de la enfermedad COVID-19) tuvieron un valor de 5 y de acuerdo con la clasificación final (junto al resultado de PCR) tuvieron un valor de 6. La clasificación CO-RADS asigna un nivel de sospecha para la enfermedad según los hallazgos encontrados en la imagen por tomografía, dichos valores van desde muy bajo, CO-RADS 1, hasta muy alto, CO-RADS 5, y CO-RADS 6 que corresponde a pacientes con hallazgos típicos y PCR positivo (Elizalde, *et al.*, 2020). Los hallazgos tomográficos típicos en pacientes con COVID-19 se caracterizan por la presencia de opacidades

múltiples en vidrio esmerilado de distribución periférica y basal, engrosamiento vascular, patrón empedrado o adoquín desordenado (crazy paving), dichos hallazgos fueron los reportados en los pacientes de este estudio (Elizalde, *et al.*, 2020).

Tabla 12. Hallazgos tomográficos en pacientes con COVID-19 clasificados de acuerdo a la Escala CO-RADS de Elizalde, *et al.* 2020

Gravedad de la enfermedad COVID-19	Clasificación de CO-RADS por Tomografía	Clasificación Final Tomografía + Resultado de PCR	Hallazgos tomográficos
Leves-Moderados	CO-RADS 5	CO-RADS 6	Típicos de COVID-19
Graves	CO-RADS 5	CO-RADS 6	Típicos de COVID-19
Críticos	CO-RADS 5	CO-RADS 6	Típicos de COVID-19

Requerimiento de Ventilación Mecánica en pacientes con COVID-19

Generalmente cuando los pacientes comienzan a presentar una insuficiencia respiratoria es necesario proporcionar ventilación mecánica. En los primeros reportes sobre la sobrevivencia de pacientes conectados a ventiladores, la tasa de mortalidad de quienes usaban estos aparatos al comienzo de la crisis fue cercana al 100% en EUA (Montes, 2020). Un informe que evaluó los casos del primer mes del brote en la provincia de Hubei encontró que el 97% de los pacientes críticos intubados murió. Otro informe inicial estimó en 81% la mortalidad entre individuos ventilados en Wuhan. Las cifras de mortalidad en pacientes que son conectados a ventiladores mecánicos oscilan entre el 55% y 85% (Montes, 2020).

En este estudio el porcentaje de pacientes que fueron intubados fue de 68.18% (16/22), de ese porcentaje, el 45.5% (10/22) pertenecía al grupo con COVID-19 crítico y el 22.72% (5/22) al grupo con COVID-19 grave. En el grupo de COVID-19 grave el 62.5% (5/8) de pacientes fue intubado y de acuerdo con lo reportado, lograron sobrevivir, caso contrario al grupo de COVID-19 crítico en el que el 100% (10/10) de los pacientes fueron intubados y el 100% (10/10) falleció. El porcentaje de pacientes que estaban conectados y fallecieron (45.5%) fue menor al rango reportado por Montes, (2020). En el grupo leve no hubo ningún paciente con necesidad de ventilación mecánica como se puede observar en el grafico 10.

Requerimiento de ventilación mecánica en pacientes con COVID-19

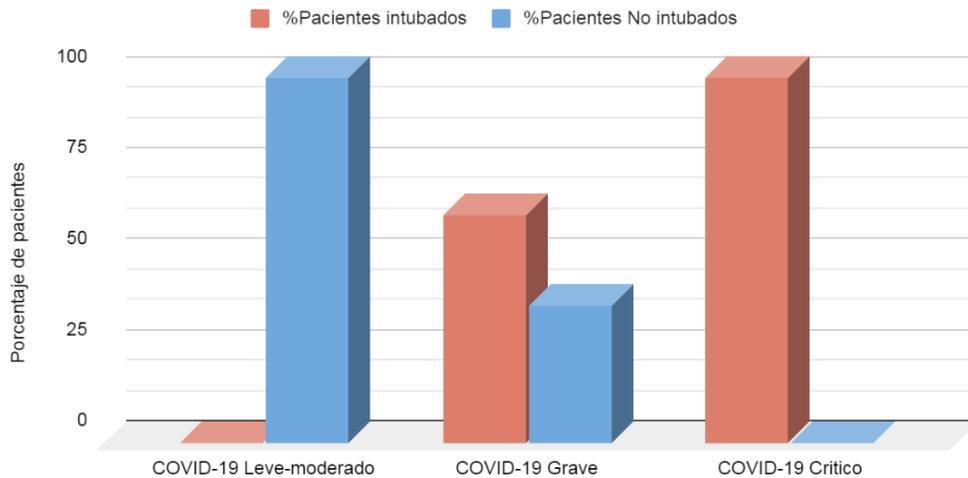
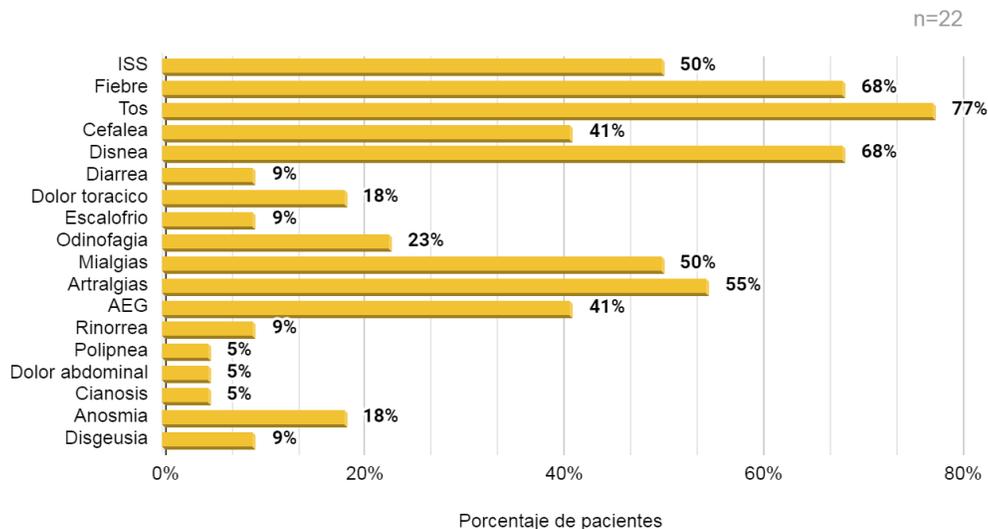


Gráfico 10. Requerimiento de ventilación mecánica en pacientes con COVID-19. En el grupo de COVID-19 grave el 62.5% de pacientes fue intubado y en grupo de COVID-19 crítico el 100% de los pacientes requirió uso de ventilador mecánico.

Características clínicas de los pacientes con COVID-19

Los signos y síntomas más frecuentes encontrados fueron: tos con 77.27% (17/22), fiebre con 68.18% (15/22), disnea con 68.18% (15/22), artralgias con 54.54% (12/22), mialgia con 50% (11/22) y síntomas poco comunes como dolor torácico con 18.18% (4/22), diarrea con 9.09% (2/22), escalofrío con 9.09% (2/22), rinorrea con 9.09% (2/22) y disgeusia con 9.09% (2/22), como se puede observar en el gráfico 11.

Signos y síntomas más comunes en pacientes con COVID-19



ISS=Inicio súbito de los síntomas AEG= Ataque al Estado General

Gráfico 11. Signos y síntomas más frecuentes en los pacientes con COVID-19. La fiebre, tos y cefalea son los síntomas más comunes seguidos de la presentación de mialgias y artralgias.

Estos datos coinciden con lo reportado por varios autores, como Parra, *et al.* (2020) que refiere que la enfermedad COVID-19 tiene un gran espectro de signos y síntomas y predominantemente se presenta con tos y fiebre, lo que resulta en una proporción de pacientes que desarrollan síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA); también indica que puede causar síntomas gastrointestinales como diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal, los cuales se han reportado entre el 11.5%- 32% de los pacientes según su análisis.

En cada uno de los grupos de estudio, los signos y síntomas fueron variables, en los pacientes graves y críticos la cantidad de síntomas presentados fue relativamente mayor que en los pacientes leve-moderado, como se puede observar en la tabla 13.

Tabla 13. Signos y síntomas más frecuentes en los pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad.

Signos y síntomas	Leves-Moderados n=4 (%)	Graves n=8 (%)	Críticos n=10 (%)
Inicio súbito de los síntomas	75	50	40
Fiebre	50	62.5	80
Tos	100	62.5	80
Cefalea	50	37.5	40
Disnea	75	75	60
Diarrea	0	0	20
Dolor torácico	25	12.5	20
Escalofrió	25	12.5	0
Odinofagia	75	12.5	10
Mialgias	75	37.5	50
Artralgias	50	50	60
Ataque al estado general	25	37.5	50
Rinorrea	0	0	20
Polipnea	0	12.5	0
Dolor abdominal	0	0	10
Cianosis	0	12.5	0
Anosmia	25	12.5	20
Disgeusia	0	12.5	10
(% de pacientes que lo presentaron de acuerdo al grupo de estudio)			

Parámetros sanguíneos en pacientes con COVID-19

Una de las características clínicas que se ha reportado en los pacientes con COVID-19 son las alteraciones en los parámetros sanguíneos. Espinoza, *et al.* (2020) ha

reportado que los hallazgos hematológicos más comunes en los pacientes COVID-19 son: linfopenia, neutrofilia, eosinofilia, trombocitopenia leve, y se han descrito algunos casos de trombocitosis. En este caso se realizó el seguimiento de cada paciente a lo largo de su estancia en el hospital y se recabaron los valores de los parámetros hematológicos antes mencionados poniendo mayor atención en el día que se realizó la toma 2 (tabla 14), ya que es en este día en que se puede evaluar de manera más adecuada la evolución de los pacientes de acuerdo con los parámetros hematológicos y, de acuerdo con los valores de referencia, se determinó la presencia o ausencia de dichas alteraciones.

Tabla 14. Valores reportados en los parámetros sanguíneos que se ven más frecuentemente alterados en los pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad en la toma 2 evaluada en este estudio.

No. Paciente	Plaquetas 130,000-400,000/ μL	Neutrófilos 1.9-8x10 ³ / μL	Linfocitos 0.9-5.2x10 ³ / μL	VSG 0-13 mm/hr	Ferritina 10-370 ng/mL	PCR 0-0.5 mg/dL
8	591,000	5.84	0.89	SD	SD	SD
12	309,000	6.68	0.76	SD	SD	10.5
13	424,000	9.86	1.38	SD	SD	SD
22	318,000	4.14	1.25	SD	45	4.84
10	245,529	9.06	0.73	49	389	4.18
14	285,250	7.13	0.66	SD	SD	SD
15	412,608	14.16	0.86	52.75	1248	17.71
17	249,833	6.85	1.28	41.5	1102	3.47
18	254,071	8.28	0.79	SD	384	17.95
19	31,590	3.07	0.91	74	>1500	19.58
20	353,933	11.07	0.78	SD	925	SD
21	193,071	18.30	0.43	36.5	537	2.50
1	194,800	14.72	0.37	56	632	8.15
2	191,000	11.33	1.08	SD	SD	SD
3	248,200	7.89	0.56	SD	1143	19.9
4	299,000	10.465	0.38	35	393	SD
5	102,700	8.84	1.15	39.6	639	7.14
6	232,800	11.92	0.21	51	562	5.67
7	288,000	7.83	0.53	SD	SD	SD
9	261,500	14.09	0.71	57	SD	12.9
11	180,600	13.17	0.55	SD	SD	19.9
16	162,125	11.25	0.30	44	1067	5.51

PCR= Proteína C reactiva

VSG= Velocidad de sedimentación globular

SD=Sin dato

De acuerdo con Espinoza, *et al.* (2020) se sabe que los recuentos absolutos de neutrófilos aumentan en los primeros días tras del ingreso y comienzan a disminuir una semana después (Valor normal= $1.9-8 \times 10^3/\mu\text{L}$). La neutrofilia (aumento en el número absoluto de neutrófilos circulantes) en la segunda toma se observó en mayor porcentaje en pacientes del grupo crítico (80%) seguidos del grupo grave (62.5%) y en menor proporción (25%) en el grupo leve-moderado, como se puede observar en la tabla 15.

Se ha demostrado que los linfocitos (Valor Normal= $0.9-5.2 \times 10^3/\mu\text{l}$) expresan el receptor ACE-2 en su superficie; por lo tanto, el virus puede infectar directamente estas células y finalmente producir lisis provocando linfopenia (menor número linfocitos en sangre). La activación de las citocinas proinflamatorias puede inducir una atrofia de los órganos linfoides, incluyendo el bazo, provocando a su vez apoptosis de los linfocitos (Espinoza, *et al.* 2020). En este caso la linfopenia, en la segunda toma, estuvo presente en los 3 grupos, destacando el grupo crítico, en el que el 80% de los pacientes la presentó, seguido del grupo grave (75%) y el grupo leve-moderado (50%).

Se ha reportado que en la infección por SARS-CoV-2, la trombocitopenia (Valor de plaquetas menor a $130,000/\mu\text{L}$) se debe a un ataque directo del virus sobre las plaquetas y las células progenitoras de megacariocitos en la médula ósea. La interacción funcional entre las plaquetas (Valor normal= $130,000-400,000/\mu\text{L}$) y el sistema inmunológico innato promueve la tromboinflamación y el daño tisular (Rowaiye *et al.*, 2021). La activación plaquetaria potencia el reclutamiento, activación y trans migración de células inmunes innatas. La progresión y resolución de la inflamación de las plaquetas se promueve de una manera específica de la enfermedad. Además, la tromboinflamación está regulada diferencialmente por interacciones plaquetas-leucocitos. A medida que avanza la enfermedad grave por COVID-19, el recuento de plaquetas disminuye, esto de acuerdo con lo reportado por Rowaiye *et al.* (2021). En este caso, en la segunda toma, se observó únicamente en el grupo grave (12.5%) y en el grupo crítico (10%), teniendo valores normales en la mayoría de los pacientes (de acuerdo con el valor de referencia). Estos datos se determinaron de acuerdo con los valores de referencia de cada uno de los parámetros. Los valores de referencia pueden

variar de un laboratorio a otro, en este caso se utilizaron los valores de referencia reportados por Laboratorio central del Hospital Juárez de México.

Mulchandani *et al.* (2021) reporta que los pacientes COVID-19 de los grupos graves se caracterizaron por tener niveles plasmáticos más altos de biomarcadores relacionados con la infección como la velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva y procalcitonina. En este caso se realizó el seguimiento de los pacientes a lo largo de su estancia en el hospital y se observó un mayor porcentaje de pacientes con elevación de la ferritina (valores por encima de 370 ng/mL) en el grupo de COVID-19 grave (87.5%) y crítico (60%) en comparación con el grupo leve-moderado (25%). La ferritina sérica (Valor normal= 10-370 ng/mL) es un marcador de inflamación y desregulación inmunitaria que está bien establecida. Un aumento en la producción de ferritina celular permite una mayor unión del hierro intracelular. Este es un mecanismo de defensa del huésped para inhibir la producción de radicales libres. La ferritina sérica se origina a partir de la fuga de las células dañadas y, por lo tanto, sirve como un importante marcador de enfermedad. A medida que la ferritina sale de las células al suero, deja un hierro libre y carece de la mayor parte del hierro que contiene intracelularmente (Rowaiye *et al.*, 2021). Aunque la ferritina sérica es benigna, el hierro no unido causa además daño celular a través de la oxidación de lípidos. Dado que los glóbulos rojos contienen el mayor volumen de ferritina, el hierro libre distorsiona su estructura y función. El hierro libre también provoca cambios patológicos en la morfología de la fibrina, lo que hace que atrape los eritrocitos deformados. Los datos clínicos sugieren que el aumento del nivel de ferritina está relacionado con la gravedad de la enfermedad por COVID-19 y como se ha observado en este estudio efectivamente los valores de ferritina son más altos en los grupos grave y crítico en comparación con el grupo leve los valores observados fueron normales de acuerdo a los valores de referencia como se puede observar en la tabla 14.

Los tres grupos de estudio presentaron valores elevados de Proteína C Reactiva (por encima de 0.5 mg/dL): 50% de los pacientes del grupo leve moderado, 75% de los pacientes del grupo grave y 70% de los pacientes del grupo crítico. La proteína C reactiva (PCR) es un reactante de fase aguda, que está notablemente elevado en

pacientes con COVID-19 de acuerdo con lo reportado por Rowaiye *et al.* (2021). La PCR (Valor normal=0-0.5 mg/dL) es un indicador útil para determinar la gravedad de la enfermedad y un predictor confiable del síndrome de liberación de citocinas. Los niveles extremadamente altos de PCR están directamente relacionados con un mal pronóstico de la enfermedad (Rowaiye *et al.*, 2021). Como se puede observar en la tabla 15, el grupo crítico tuvo un valor más elevado en comparación con los otros grupos, por lo que coincide con lo reportado por Rowaiye *et al.* (2021). En respuesta a la estimulación de IL-6, las células hepáticas liberan PCR. Según la relación entre los niveles de PCR e IL-6, se puede utilizar como marcador sustituto. El monitoreo diario es importante para distinguir entre aquellos cuya fiebre desaparecería y aquellos cuyos síntomas gravitarían hacia una tormenta de citocinas. Un paciente cuya PCR excede este umbral tiene un riesgo particularmente alto de sufrir una tormenta de citocinas. (Rowaiye *et al.*, 2021).

Los valores de Velocidad de Sedimentación Globular (VSG) estuvieron elevados (por encima de 13 mm/hr) únicamente en el grupo de COVID-19 grave (62.5%) y crítico (60%), en el grupo leve-moderado no se encontraron datos de este parámetro. La velocidad de sedimentación globular (Valor normal= 0-13mm/hr) mide la velocidad a la que los glóbulos rojos se depositan en la sangre completa anticoagulada. Durante la inflamación, la velocidad de sedimentación globular (VSG) es más rápida de lo habitual porque una alta proporción de fibrinógeno en la sangre hace que los glóbulos rojos se peguen y aumente su densidad (Rowaiye *et al.*, 2021). La VSG se encuentra elevada en prácticamente todos los procesos que cursan con inflamación (enfermedades inflamatorias reumáticas o no e infecciones) y en algunas neoplasias, por lo que es totalmente inespecífica. Se eleva a las 24 h de iniciado el estímulo inflamatorio y no suele normalizarse hasta al cabo de cinco a diez días de su resolución (Merino, 2002). En general se puede afirmar que cualquier situación que aumente el fibrinógeno puede elevar la velocidad de sedimentación (p. ej., el embarazo, la diabetes, la insuficiencia renal en su fase terminal, la insuficiencia coronaria, las anemias macrocíticas, etc) (Merino, 2002). Los rangos de VSG suelen ser muy altos durante la inflamación grave debido a una infección de acuerdo con lo reportado por Rowaiye *et al.* (2021). Los valores de VSG observados en el grupo grave y crítico de este estudio fueron muy

elevados con respecto al valor de referencia, si se toma en cuenta que en dichos grupos existe un mayor porcentaje de pacientes con diabetes y junto con la infección por SARS-CoV-2 es comprensible que los valores de VSG estén más elevados.

Tabla 15. Alteraciones en los parámetros sanguíneos más frecuentes en los pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad.

Parámetros sanguíneos	Leves-Moderados n=4 (%)	Graves n=8 (%)	Críticos n=10 (%)
NEUTROFILIA	25%	62.5%	80%
TROMBOCITOPENIA	0	12.50%	10%
LINFOPENIA	50%	75%	80%
VSG ELEVADA	SD	62.5%	60%
FERRITINA ELEVADA	25%	87.5%	60%
PCR ELEVADA	50%	75%	70%
% de pacientes con alteración en los parámetros			

PCR= Proteína C reactiva VSG= Velocidad de sedimentación globular SD=Sin dato

La importancia de evaluar estos parámetros radica en su papel, de algunos de ellos, como marcadores de inflamación o como pronóstico para determinar, en ciertos casos, como va evolucionando el paciente y por lo tanto como deberá ser su manejo

Comorbilidades en pacientes con COVID-19

En los casos de COVID-19 más graves en México, la hipertensión es la comorbilidad más común con un diagnóstico reportado del 18,61%, la obesidad ocupa el segundo lugar, con un 16,80% de presencia en los casos confirmados y la diabetes un 14,58% (Rocha, 2020). Es importante destacar que en México la frecuencia de diabetes, hipertensión y obesidad es muy alta en los adultos mayores, lo que puede conllevar a mayor riesgo de que evolución de la enfermedad por COVID-19 se complique y sea más crítica. Las comorbilidades más frecuentes en los pacientes con COVID-19 evaluados en este estudio fueron: Diabetes con 45.45% (10/22), Hipertensión con 40.90% (9/22), Obesidad con 9.09% (2/22) y VIH con 4.54% (1/22), hubo un 27.27% (6/22) de pacientes sin comorbilidad conocida como se puede observar en el grafico 12.

Comorbilidades en pacientes con COVID-19

n= 22

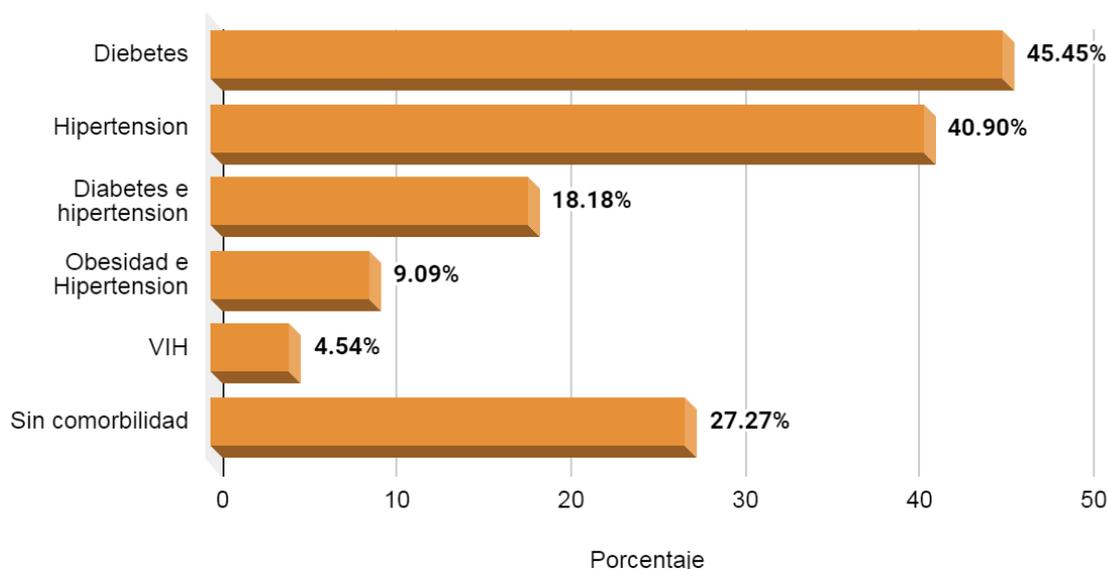


Gráfico 12. Comorbilidades más frecuentes en pacientes con COVID-19. La diabetes y la hipertensión fueron las comorbilidades con más incidencia con 45.45% y 40.90% respectivamente. Un 27.27% de los pacientes no tenía comorbilidades preexistentes conocidas.

Se presentaron casos de pacientes con dos de estas comorbilidades como Diabetes con hipertensión 4/22 (18.8%) y obesidad con hipertensión 2/22 (9.09%).

En el gráfico 13 se puede observar la frecuencia de las comorbilidades por cada grupo de estudio. La diabetes está presente en los 3 grupos, siendo en mayor porcentaje en el grupo de COVID-19 crítico (50%). La diabetes es una de las comorbilidades más frecuentes en personas con COVID-19, con una prevalencia que varía entre el 7 y el 30% de acuerdo con Li, *et al.* (2020); una vez adquirida la COVID-19, la diabetes ha demostrado de forma consistente ser un factor de riesgo de mal pronóstico. Según Singh, *et al.*, (2020) la probabilidad de desarrollar un cuadro severo e ingresar en las unidades de cuidados intensivos (UCI) es de más del doble en las personas con diabetes y la mortalidad descrita es hasta 3 veces superior (21-31%) lo que coincide con lo observado en este estudio, ya que el grupo crítico, además de tener la mayor mortalidad, fue el grupo con mayor presencia de diabetes.

Comorbilidades mas frecuentes en pacientes COVID-19

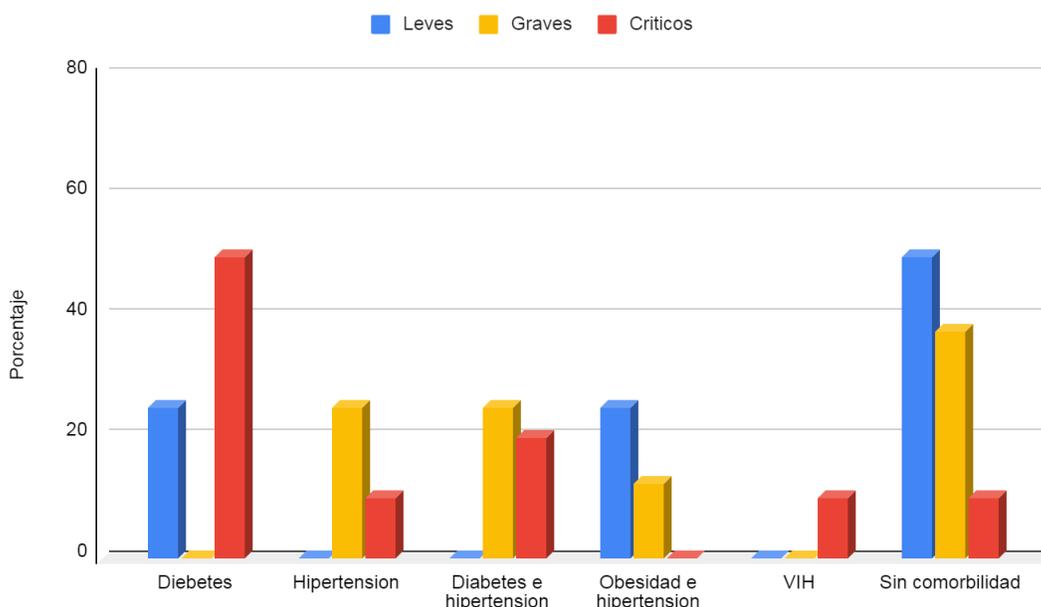


Gráfico 13. Comorbilidades más frecuentes en pacientes con COVID-19 en diferentes grados de gravedad. En el grupo de pacientes con COVID-19 Leve, la diabetes y la obesidad con hipertensión fueron las únicas comorbilidades reportadas, el 50% de los pacientes no presentaban ninguna comorbilidad conocida. En el grupo de pacientes con COVID-19 Grave, tanto la hipertensión como la diabetes con hipertensión fueron las comorbilidades más frecuentes (25% c/u) seguidas de la obesidad con hipertensión (13%), el 38% de los pacientes no presentaban ninguna comorbilidad conocida. En el grupo de pacientes con COVID-19 Grave la diabetes fue la comorbilidad más común con un 50% seguida de la diabetes con hipertensión (20%) y la hipertensión (10%), un bajo porcentaje tuvo VIH (10%) y solo el 10% de los pacientes no presentaban ninguna comorbilidad conocida.

La hipertensión de igual manera está presente en los 3 grupos, pero en un mayor porcentaje en el grupo de COVID-19 grave (62.5% tomando en cuenta las 3 formas en que se agruparon: hipertensión únicamente o hipertensión con otra comorbilidad). La obesidad solo estuvo presente en el grupo de leves-moderados y graves, en un mayor porcentaje en el grupo leve (25%), el VIH solo se presentó en el grupo de COVID-19 crítico (10%) y hubo un mayor porcentaje de pacientes sin comorbilidad conocida en el grupo de pacientes leves (50%).

La existencia de base en la diabetes de un estado de inflamación crónica, la hipertensión u otras comorbilidades sumando la presencia de la infección por SARS-COV-2 junto con el deterioro de la respuesta inmunológica debido a la edad avanzada, la necesidad de ventilador mecánico y las complicaciones que se pueden presentar por la estancia hospitalaria están entre los mecanismos fisiopatológicos asociados al aumento de la mortalidad de COVID-19.

Relación entre la Carga Viral y Expresión de Citocinas en COVID-19

De acuerdo con Alcántara, *et al.* (2021) la expresión clínica de la infección por SARS-CoV-2 consta de tres fases. La fase inicial se caracteriza por gran replicación viral, lo que conlleva una carga viral alta, con fiebre, tos y quebrantamiento general que se prolonga durante varios días. En pacientes adultos con formas leves de COVID-19 la PCR puede resultar positiva alrededor de 10-12 días, después del inicio de los síntomas en el tracto respiratorio superior, alrededor de 24 días en el tracto respiratorio inferior. La segunda fase se asocia con fiebre alta, hipoxemia y progresión de la sintomatología respiratoria hasta una neumonía bilateral a pesar de que se aprecia analíticamente ya un declive en la carga viral al final de esta fase. En las formas moderadas o graves, la duración media en el tracto respiratorio superior es de 16 días, 23 días en el tracto respiratorio inferior. Con independencia de la gravedad de la enfermedad, la probabilidad de detectar ARN viral en el tracto respiratorio superior decrece a partir de la segunda semana tras la aparición de los síntomas (Alcántara, *et al.* 2021). Durante la tercera fase, aproximadamente un 20% de los pacientes progresan a un SARS, que con frecuencia tiene desenlace fatal. Ya que durante esta fase hay una progresiva caída de carga viral, la patogenia de esta crisis se cree que es debida a una exacerbada respuesta inflamatoria por parte del huésped a la que se ha denominado "tormenta de citocinas", y que, al generar daño alveolar difuso e hipoxemia grave, facilita la aparición de sepsis secundarias letales (Serrano, *et al.*, 2020). De acuerdo con lo mencionado anteriormente se determinó que cada fase de evolución corresponde a cada uno de los grupos de estudio evaluados, en cada grupo se analizó tanto la carga viral como la expresión de citocinas (IL-1 β , IL-6 y TNF- α), de cada paciente en las dos tomas realizadas por medio de cuantificación absoluta y cuantificación relativa respectivamente.

Para la realización de la cuantificación absoluta se utilizó como estándar externo un producto amplificado por PCR del Gen E de SARS-CoV-2 clonado en un plásmido. De acuerdo con Solano *et al.* (2018) los protocolos cuantitativos de PCR en tiempo real estiman de manera confiable el número de copias de RNA genómico. Una vez optimizada la PCR en tiempo real y a partir de las diluciones realizadas del estándar del

ADN plasmídico, se obtuvo la curva estándar para la cuantificación del número de copias de SARS-CoV-2. Para la elaboración de la curva se realizaron 5 ensayos, cada uno por triplicado, con el fin de comprobar la reproducibilidad de la técnica. La curva estandarizada tuvo un coeficiente de correlación de 0.995 y una eficiencia de 99.6 %.

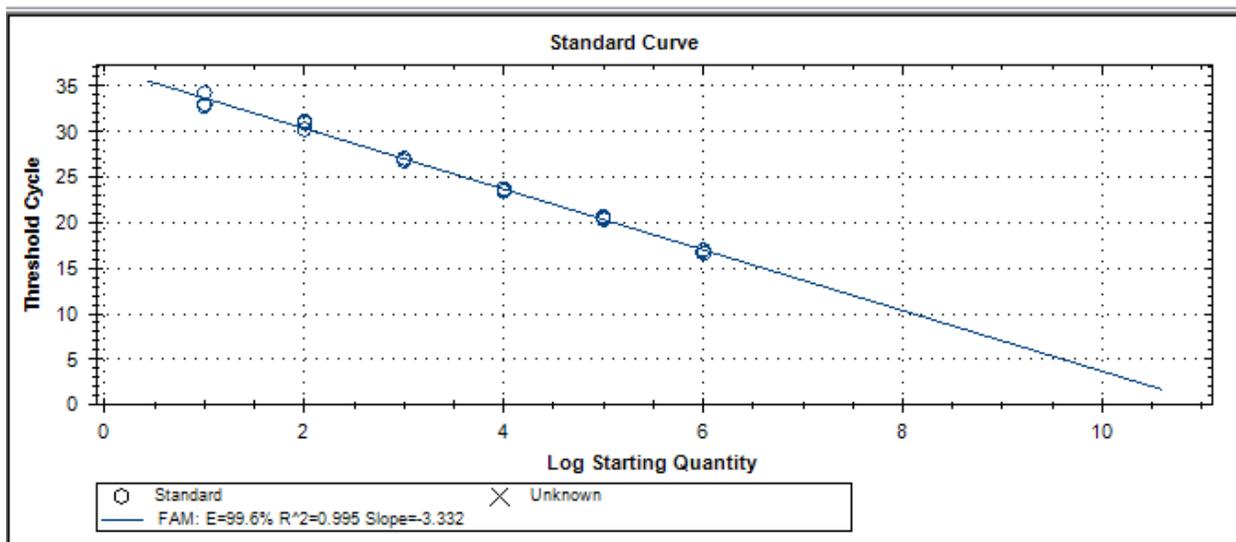


Figura. 10 Curva de calibración por triplicado, con una Eficiencia del 99.6% y con un Coeficiente de determinación (R2) de 0.995 (un valor $R^2 > 0,99$ proporciona una buena confianza en la correlación de los valores)

Los resultados de la carga viral se reportaron en la tabla 16 como copias/ μL , así como en porcentaje de aumento o disminución de esta entre las tomas según fue el caso. El límite de detección fue de 10 copias/ μL .

Tabla 16. Resultados de la carga viral por medio de cuantificación absoluta de los pacientes con COVID-19.

No. Paciente	Días de evolución FIS a Toma 1	Resultado CV Toma 1	Días de evolución FIS a Toma 2	Resultado CV Toma 2	Porcentaje de aumento o disminución de la carga viral
1	6	13,810,000 copias/ μL	9	81,690,000 copias/ μL	Aumento del 83.09%
2	6	35,680,000 copias/ μL	11	1,404,000 copias/ μL	Disminución de 96.06%
3	4	65,520,000 copias/ μL	10	1,107,000,000 copias/ μL	Aumento del 94.08%
4	15	27,630,000 copias/ μL	18	2,521,000 copias/ μL	Disminución de 90.87%
5	3	127,700 copias/ μL	8	9409 copias/ μL	Disminución de 92.63%
6	9	588,900 copias/ μL	14	3112 copias/ μL	Disminución de 99.47%
7	1	69,990,000 copias/ μL	8	129,600 copias/ μL	Disminución de 99.81%
8	9	31,970 copias/ μL	13	1789 copias/ μL	Disminución de 94.40%
9	4	76,430 copias/ μL	8	2070 copias/ μL	Disminución de 97.29%

10	2	101,100 copias/ μ L	9	105,100 copias/ μ L	Aumento de 3.95%
11	10	202,400 copias/ μ L	16	16,650 copias/ μ L	Disminución de 91.77%
12	5	99,620 copias/ μ L	10	207 copias/ μ L	Disminución de 99.79%
13	9	29,440 copias/ μ L	14	1,006 copias/ μ L	Disminución de 96.58%
14	3	781,800 copias/ μ L	9	187,400 copias/ μ L	Disminución de 76.02%
15	6	257,900 copias/ μ L	10	228.4 copias/ μ L	Disminución de 99.91%
16	5	95,050 copias/ μ L	17	419.8 copias/ μ L	Disminución de 99.55%
17	6	137,000 copias/ μ L	10	2118 copias/ μ L	Disminución de 98.45%
18	13	139,500 copias/ μ L	17	1883 copias/ μ L	Disminución de 98.65%
19	16	239,600 copias/ μ L	19	1,472,000 copias/ μ L	Aumento del 83.72%
20	16	1037 copias/ μ L	22	3953 copias/ μ L	Aumento del 73.76%
21	4	1,276,000 copias/ μ L	18	15,120 copias/ μ L	Disminución de 98.81%
22	4	114,900 copias/ μ L	11	>10 copias/ μ L	Disminución de 99.99%

FIS= Fecha de inicio de Síntomas CV=Carga Viral

En algunos estudios, como el caso de Silva, *et al.* (2021), se ha demostrado que la carga viral en muestras de exudado nasofaríngeo se correlaciona positivamente con importantes factores inflamatorios observados en el SARS-CoV-2, incluidos el TNF- α , IL-1 e IL-6, así como diversos interferones y viremia plasmática, que también se ha asociado con la gravedad de la enfermedad, con la linfopenia.

Para poder relacionar la carga viral con la expresión de las citocinas se evaluó la expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en ambas tomas, para ello se realizó la normalización con el gen GAPDH el cual, por medio del método comparativo de Ct, se determinó que no se ve alterado en presencia de la enfermedad COVID-19 y se comparó con el grupo control, se obtuvieron valores cercanos a la unidad en todos los grupos. Una vez comprobado, se determinó la expresión de cada uno de los genes tanto en el grupo control como en los grupos COVID-19 por medio del método comparativo de Ct, la expresión relativa de cada grupo fue el promedio de la expresión de cada paciente.

Expresión de citocinas en Grupo Control

Tabla 17. Expresión relativa del Gen IL-1 β en el grupo de pacientes sanos (Control) por el método del 2- $\Delta\Delta$ Ct.

Numero de Control	IL-1 Ct promedio	GAPDH Ct promedio	Δ Ct	Promedio Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	2 ^{^-} ($\Delta\Delta$ Ct)	Expresión Relativa
43	25.34	21.59	3.75	3.827	-0.077	1.054822317	1.187020541
44	24.38	21.06	3.32	3.827	-0.507	1.421092043	
46	24.87	22.03	2.84	3.827	-0.987	1.982059127	
47	25.18	21.5	3.68	3.827	-0.147	1.107264584	
48	26.34	22.82	3.52	3.827	-0.307	1.237132479	
49	26.12	22.68	3.44	3.827	-0.387	1.307671349	
52	28.79	23.08	5.71	3.827	1.883	0.2711193522	
53	24.52	21.23	3.29	3.827	-0.537	1.450952208	
54	26.58	21.43	5.15	3.827	1.323	0.3997029152	
55	28.45	23.27	5.18	3.827	1.353	0.3914771481	
56	26.64	21.51	5.13	3.827	1.303	0.4052825599	
57	27.71	23.25	4.46	3.827	0.633	0.6448341253	
58	28.49	23.31	5.18	3.827	1.353	0.3914771481	
59	27.77	23.89	3.88	3.827	0.053	0.9639298077	
61	26.62	23.72	2.9	3.827	-0.927	1.901318202	
62	24.91	21.53	3.38	3.827	-0.447	1.363202607	
63	26.15	22.53	3.62	3.827	-0.207	1.154285418	
64	24.62	21.19	3.43	3.827	-0.397	1.316766922	
65	24.18	21.88	2.3	3.827	-1.527	2.881859498	
66	24.44	22.06	2.38	3.827	-1.447	2.726405215	
PROMEDIO			3.827			1.218632751	

Tabla 18. Expresión relativa del Gen TNF- α en el grupo de pacientes sanos (Control) por el método del 2- $\Delta\Delta$ Ct.

Numero de Control	Promedio Ct TNF	GAPDH Ct promedio	Δ Ct	Promedio Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	2 ^{^-} ($\Delta\Delta$ Ct)	Expresión Relativa
43	26.03	21.59	4.44	3.383684211	1.056315789	0.48085846	1.261590642
44	24.66	21.06	3.6	3.383684211	0.2163157895	0.860760757	
46	24.28	22.03	2.25	3.383684211	-1.133684211	2.194183541	
47	24.07	21.5	2.57	3.383684211	-0.8136842105	1.75769434	
49	25.75	22.68	3.07	3.383684211	-0.3136842105	1.242877587	
52	29.11	23.08	6.03	3.383684211	2.646315789	0.1597274541	
53	24.19	21.23	2.96	3.383684211	-0.4236842105	1.341348587	
54	25.09	21.43	3.66	3.383684211	0.2763157895	0.8256969095	
55	28.66	23.27	5.39	3.383684211	2.006315789	0.2489079492	
56	24.87	21.51	3.36	3.383684211	-0.02368421053	1.016552137	

57	26.32	23.25	3.07	3.383684211	-0.3136842105	1.242877587
58	26.99	23.31	3.68	3.383684211	0.2963157895	0.8143292962
59	27.4	23.89	3.51	3.383684211	0.1263157895	0.916168084
61	26.53	23.72	2.81	3.383684211	-0.5736842105	1.488319443
62	25.59	21.53	4.06	3.383684211	0.6763157895	0.6257612423
63	26	22.53	3.47	3.383684211	0.08631578947	0.9419250747
64	24.01	21.19	2.82	3.383684211	-0.5636842105	1.47803887
65	23.27	21.88	1.39	3.383684211	-1.993684211	3.982527187
66	24.21	22.06	2.15	3.383684211	-1.233684211	2.351667691
PROMEDIO				3.383684211		1.261590642

Tabla 19. Expresión relativa del Gen IL-6 en el grupo de pacientes sanos (Control) por el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Numero de Control	Promedio Ct IL-6	GAPDH Ct promedio	ΔCt	Promedio ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$	Expresión Relativa
43	30.31	21.59	8.72	8.07	0.65	0.6372803137	1.196549127
44	30.01	21.06	8.95	8.07	0.88	0.5433674313	
46	29.3	22.03	7.27	8.07	-0.8	1.741101127	
47	28.97	21.5	7.47	8.07	-0.6	1.515716567	
48	30.27	22.82	7.45	8.07	-0.62	1.536875181	
49	29.76	22.68	7.08	8.07	-0.99	1.986184991	
52	30.3	23.08	7.22	8.07	-0.85	1.802500925	
53	30.4	21.23	9.17	8.07	1.1	0.4665164958	
54	30.29	21.43	8.86	8.07	0.79	0.578344092	
55	30.35	23.27	7.08	8.07	-0.99	1.986184991	
56	30.64	21.51	9.13	8.07	1.06	0.4796320597	
57	30.56	23.25	7.31	8.07	-0.76	1.693490625	
58	30.4	23.31	7.09	8.07	-0.98	1.972465409	
59	31.08	23.89	7.19	8.07	-0.88	1.840375301	
61	32.33	23.72	8.61	8.07	0.54	0.6877709091	
62	31.31	21.53	9.78	8.07	1.71	0.3056600694	
63	30.32	22.53	7.79	8.07	-0.28	1.214194884	
64	30.58	21.19	9.39	8.07	1.32	0.4005349388	
65	29.03	21.88	7.15	8.07	-0.92	1.892115293	
66	30.75	22.06	8.69	8.07	0.62	0.6506709277	
Promedio			8.07			1.196549127	

Mudd et al. (2021) en su estudio sobre la respuesta inmunológica en COVID-19 y en pacientes con influenza encontraron que, en contraste con las suposiciones predominantes, muy pocos (7 de 168) pacientes con COVID-19 presentaban perfiles de citocinas indicativos de síndrome de tormenta de citocinas, además que los pacientes con COVID-19 exhibieron niveles de citocinas más bajos que los pacientes con influenza. Los valores de las citocinas que evaluaron se encontraban en un rango de 0.22-1.81, en particular la IL-1 β con un valor de 0.77, el TNF- α con un valor de 0.74 y la IL-6 con un valor de 1.81 que en comparación con los valores encontrados en este estudio son relativamente similares. Los resultados de la expresión de citocinas en cada paciente se pueden observar en la tabla 20.

Tabla 20. Expresión relativa de las citocinas proinflamatorias de los grupos de pacientes con COVID-19 en la toma 1 y toma 2 por el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (SE= Sin expresión)

No. Paciente	Clasificación Final	ER IL-1 T1	ER IL-1 T2	ER IL-6 T1	ER IL-6 T2	ER TNF T1	ER TNF T2
1	CRITICO	0.17	0.58	SE	SE	0.69	0.14
2	CRITICO	0.27	0.27	SE	0.2	0.19	0.07
3	CRITICO	2.73	0.09	0.45	2.21	2.08	11.72
4	CRITICO	0.05	1.55	SE	0.59	0.28	2.04
5	CRITICO	4.6	2.13	1.5	4.89	21.31	2.29
6	CRITICO	0.33	9.54	SE	0.69	0.43	2.38
7	CRITICO	3.23	3.35	3.82	1.76	1.35	1.76
8	Leve-Moderado	2.39	1.4	3.58	1.18	0.8	0.24
9	CRITICO	3.63	9.81	0.76	1.55	1	2.05
10	GRAVE	0.43	0.01	0.93	SE	1.18	0.14
11	CRITICO	1.32	3.08	0.61	0.38	4.37	2.38
12	Leve-Moderado	1.31	2.02	0.59	0.46	0.4	0.77
13	Leve-Moderado	0.76	0.6	0.28	0.29	2.75	10.35
14	GRAVE	0.1	0.08	SE	SE	1.44	1.65
15	GRAVE	1.94	7.07	0.23	1.05	0.43	1.14
16	CRITICO	5.78	0.02	0.8	SE	0.22	0.07
17	GRAVE	1.24	2.01	2.73	0.97	0.43	0.58
18	GRAVE	0.7	5.86	0.89	4.97	2.81	2.23
19	GRAVE	1.42	0.91	5.28	0.14	0.74	0.79
20	GRAVE	7.52	17.17	1.81	1.66	1.78	2.4
21	GRAVE	1.18	0.74	0.19	0.83	0.83	1.44
22	Leve-Moderado	0.41	0.57	1.64	6.04	1.12	0.51

La siguiente tabla muestra los resultados promedio de las citocinas proinflamatorias como de la carga viral de cada grupo de estudio, como se puede observar el único parámetro variable es la carga viral ya que los valores encontrados fueron muy heterogéneos en cada grupo y las citocinas se mantienen, en algunos casos, en expresiones normales en comparación con el control.

Tabla 21. Expresión de citocinas proinflamatorias (promedio de la expresión de cada paciente por grupo de gravedad) y promedio de carga viral en los grupos con COVID-19

Toma	Grupo	IL-1	IL6	TNF	Promedio CV
Toma 1	Leves	1.22	1.52	1.27	68,982 copias/μL
	Graves	1.82	1.72	1.21	366,742 copias/μL
	Críticos	2.21	1.32	3.19	21,372,048 copias/μL
Toma 2	Leves	1.15	1.99	2.97	753 copias/μL
	Graves	4.23	1.6	1.3	223,475 copias/μL
	Críticos	3.04	1.53	2.49	119,277,626 copias/μL

De acuerdo con López *et al.* (2020) el SARS-CoV-2 induce el IFN tipo I tardíamente, lo cual ocasiona pérdida de control viral en una fase temprana de la infección hasta 48 horas después de la infección, condicionando la aparición de edema pulmonar, hipoxia severa y la acumulación de células inflamatorias en los pulmones; se ha observado progresión a fibrosis de fase tardía del SDRA, respuestas de inflamación sistémica y falla orgánica múltiple. De acuerdo con la progresión del SDRA, los blancos principales de la infección por SARS-CoV-2 son las células ciliadas del epitelio de las vías respiratorias y los neumocitos alveolares de tipo II. El SDRA también está asociado con la inducción de citocinas inflamatorias, incluidas IL-1, IL-6 y TNF α , muchas de las cuales se expresan altamente en los pulmones de pacientes con SARS. Las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α son responsables de las respuestas tempranas y amplifican las reacciones inflamatorias (Labclinics, 2020) y algunos investigadores como Parra *et al.* (2020) se han reportado elevaciones en la expresión de estas, sin embargo, al realizar la relación de cada una de las citocinas entre la toma 1 y la toma 2 y se determinó que no hay una diferencia significativa entre tomas como se observa en las siguientes gráficas. Esto puede deberse a que en la mayoría de los estudios se evaluaron dichas citocinas en muestras de suero o plasma y en este trabajo se ocupó

la capa blanca de la sangre periférica de los pacientes, ya que como se sabe las células como granulocitos y monocitos y linfocitos son los principales productores de estas citocinas.

Expresión de IL-1 β

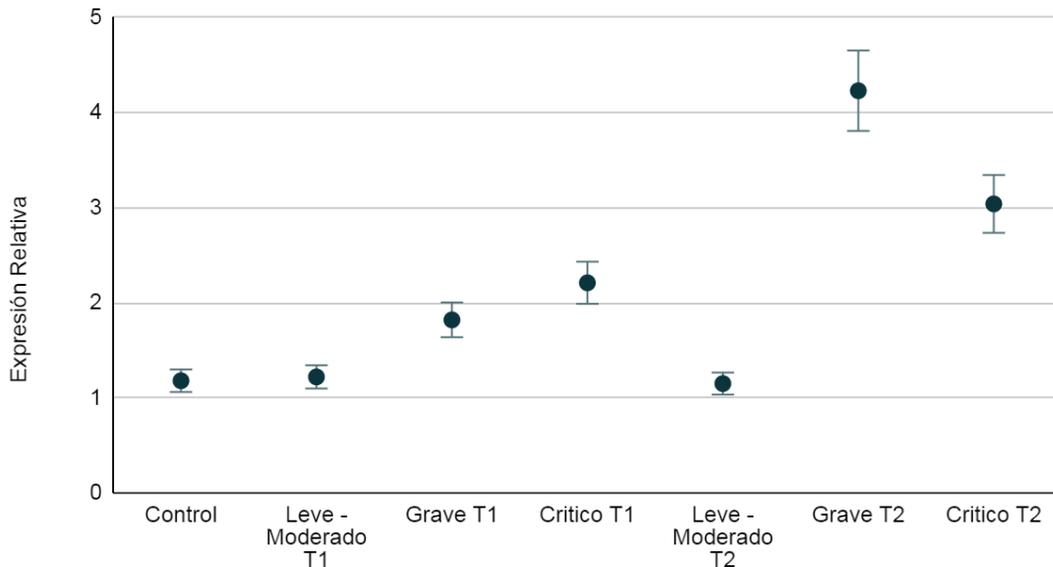


Gráfico 14. Expresión relativa del gen IL-1 β en la toma 1 vs la toma 2 en los grupos de pacientes con COVID-19 con diferentes grados de gravedad y en el grupo de pacientes sanos (control). No hubo diferencia significativa de la expresión entre la T1 y la T2 ($p=0.28$).

Expresión de IL-6

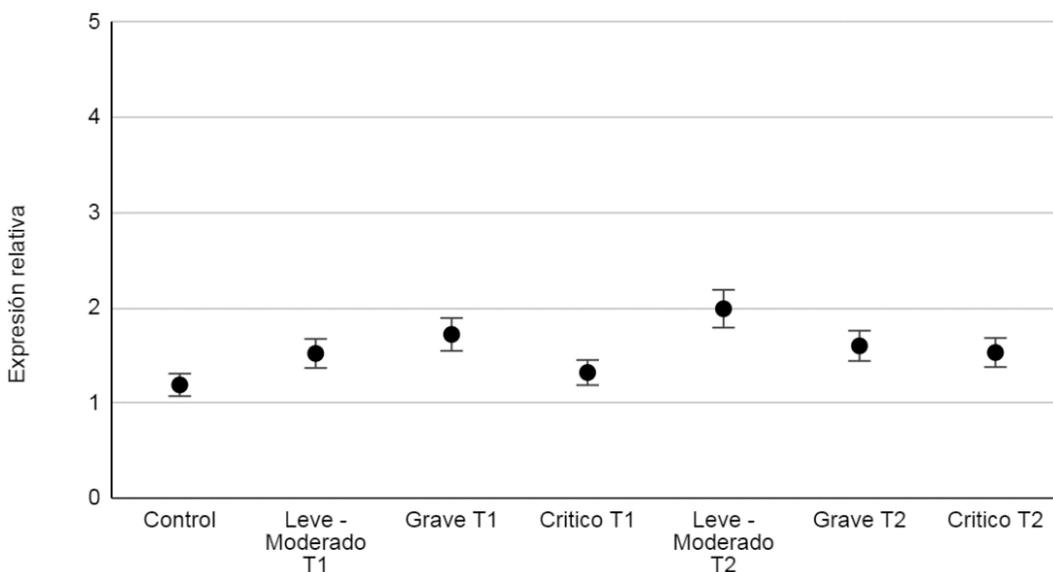


Gráfico 15. Expresión relativa del gen IL-6 en la toma 1 vs la toma 2 en los grupos de pacientes con COVID-19 con diferentes grados de gravedad y en el grupo de pacientes sanos (control). No hubo diferencia significativa de la expresión entre la T1 y la T2 ($p=0.38$).

Expresión de TNF- α

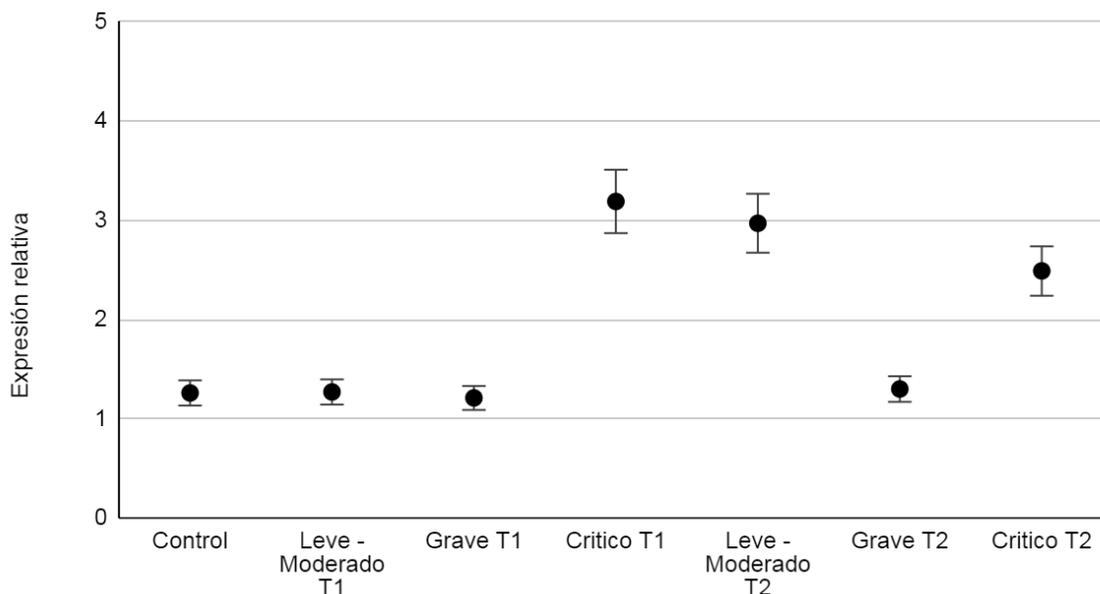


Gráfico 16. Expresión relativa del gen TNF- α en la toma 1 vs la toma 2 en los grupos de pacientes con COVID-19 con diferentes grados de gravedad y en el grupo de pacientes sanos (control). No hubo diferencia significativa de la expresión entre la T1 y la T2 ($p=0.65$).

Para poder realizar la asociación entre la carga viral y la expresión de las citocinas se evaluaron las características de cada grupo dependiendo de la gravedad de la enfermedad. En la tabla siguiente se encuentran los resultados de carga viral y expresión de citocinas de cada paciente en ambas tomas y que serán analizados más adelante.

Tabla 22. Resultados de carga viral y expresión de citocinas proinflamatorias de cada paciente tanto de la toma 1 como de la toma 2.

No. Muestra	Clasificación Final	Resultado CV Toma 1	Resultado CV Toma 2	ER IL-1 T1	ER IL-1 T2	ER IL-6 T1	ER IL-6 T2	ER TNF T1	ER TNF T2
1	Critico	13,810,000 copias/ μ L	81,690,000 copias/ μ L	0.17	0.58	SE	SE	0.69	0.14
2	Critico	35,680,000 copias/ μ L	1,404,000 copias/ μ L	0.27	0.27	SE	0.2	0.19	0.07
3	Critico	65,520,000 copias/ μ L	1,107,000,000 copias/ μ L	2.73	0.09	0.45	2.21	2.08	11.72
4	Critico	27,630,000 copias/ μ L	2,521,000 copias/ μ L	0.05	1.55	SE	0.59	0.28	2.04
5	Critico	127,700 copias/ μ L	9409 copias/ μ L	4.6	2.13	1.5	4.89	21.31	2.29
6	Critico	588,900 copias/ μ L	3112 copias/ μ L	0.33	9.54	SE	0.69	0.43	2.38
7	Critico	69,990,000 copias/ μ L	129,600 copias/ μ L	3.23	3.35	3.82	1.76	1.35	1.76

8	Leve-Moderado	31,970 copias/μL	1789 copias/μL	2.39	1.4	3.58	1.18	0.8	0.24
9	Critico	76,430 copias/μL	2070 copias/μL	3.63	9.81	0.76	1.55	1	2.05
10	Grave	101,100 copias/μL	105,100 copias/μL	0.43	0.01	0.93	SE	1.18	0.14
11	Critico	202,400 copias/μL	16,650 copias/μL	1.32	3.08	0.61	0.38	4.37	2.38
12	Leve-Moderado	99,620 copias/μL	207 copias/μL	1.31	2.02	0.59	0.46	0.4	0.77
13	Leve-Moderado	29,440 copias/μL	1,006 copias/μL	0.76	0.6	0.28	0.29	2.75	10.35
14	Grave	781,800 copias/μL	187,400 copias/μL	0.1	0.08	SE	SE	1.44	1.65
15	Grave	257,900 copias/μL	228.4 copias/μL	1.94	7.07	0.23	1.05	0.43	1.14
16	Critico	95,050 copias/μL	419.8 copias/μL	5.78	0.02	0.8	SE	0.22	0.07
17	Grave	137,000 copias/μL	2118 copias/μL	1.24	2.01	2.73	0.97	0.43	0.58
18	Grave	139,500 copias/μL	1883 copias/μL	0.7	5.86	0.89	4.97	2.81	2.23
19	Grave	239,600 copias/μL	1,472,000 copias/μL	1.42	0.91	5.28	0.14	0.74	0.79
20	Grave	1037 copias/μL	3953 copias/μL	7.52	17.17	1.81	1.66	1.78	2.4
21	Grave	1,276,000 copias/μL	15,120 copias/μL	1.18	0.74	0.19	0.83	0.83	1.44
22	Leve-Moderado	114,900 copias/μL	>10 copias/μL	0.41	0.57	1.64	6.04	1.12	0.51

CV= Carga Viral

ER= Expresión Relativa

T1=Toma 1

T2=Toma 2

SE=Sin Expresión

GRUPO COVID-19 LEVE-MODERADO

De acuerdo con las fases de la enfermedad COVID-19 propuestas por De Francisco *et al.* (2020) y a lo reportado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020) la carga viral y la presencia de citocinas pro inflamatorias está relacionado únicamente dependiendo de la fase en la que se encuentre el paciente. En la fase 1, que ocurre del día 1 al día 6-8 después del inicio de los síntomas, existe una gran carga viral en las secreciones rinofaríngeas. En pacientes con la enfermedad leve o moderada, la carga viral alcanza su punto máximo en la primera semana de infección, luego disminuye gradualmente después del día 5-7 (figura 5.), mientras que la respuesta de anticuerpos aumenta gradualmente y a menudo es detectable el día 14, es decir, la respuesta inmune inicial del huésped es capaz de controlar la infección (Cevik, *et al.*, 2020), es así que, en este periodo la infección generalmente se presenta con síntomas respiratorios y sistémicos leves, teniendo un buen pronóstico y una recuperación relativamente rápida y sin necesidad de cuidados intensivos. En el caso

particular de los pacientes con COVID-19 leve-moderado de este estudio, la carga viral disminuyó en los 4 casos evaluados; el promedio de la carga viral en la primera toma fue de 68,982.50 copias/ μ L y en la segunda toma el promedio fue de 753 copias/ μ L, es decir, hubo una disminución significativa ($p=0.02$) de la carga viral, por lo tanto, coincide con lo mencionado al inicio.

Comportamiento de la carga viral en COVID-19 Leve-moderado

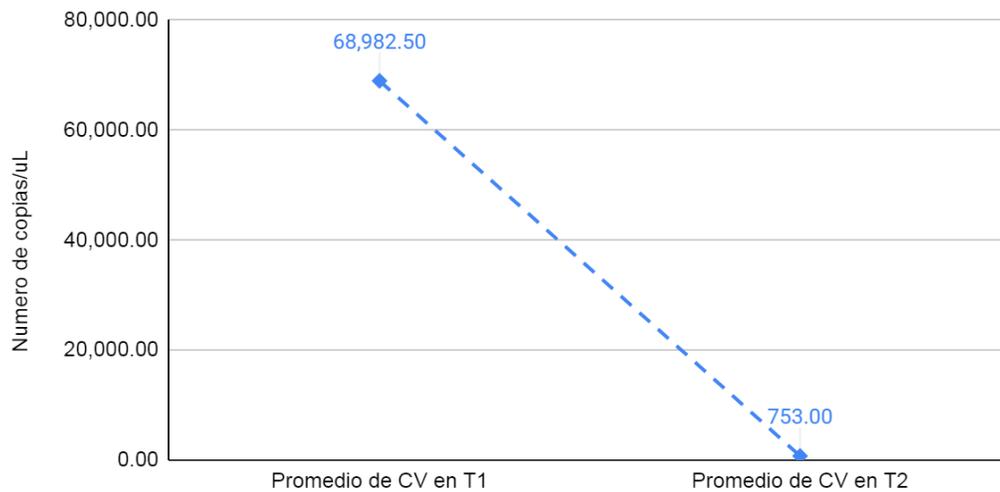


Gráfico 17. Comportamiento de la Carga viral en pacientes con COVID-19 Leve-moderado. El promedio de la carga viral en la primera toma fue de 68,982.50 copias/ μ L y para la segunda toma el promedio fue de 753 copias/ μ L, hubo una disminución significativa ($p=0.02$) de la carga viral.

En promedio la primera toma se realizó (en este grupo) a los 6 (± 2) días después del inicio de los síntomas, en este momento, de acuerdo a lo reportado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020), la carga viral es alta y debería disminuir los días siguientes; la toma 2 se realizó en promedio 12 (± 2) días después del inicio de los síntomas y el comportamiento de la carga viral, como se observa en el gráfico 12, fue una disminución importante, lo que concuerda con lo que se ha reportado, es decir, que para el día 12 en adelante, las personas que padecen la enfermedad leve-moderada, tienen una carga viral muy baja en comparación al inicio de la infección y eventualmente será indetectable.

En cuanto a la expresión de las citocinas proinflamatorias del grupo con COVID-19 leve-moderado, esta se determinó de acuerdo con el promedio de la expresión de cada paciente que se obtuvo por medio del método comparativo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los valores

cercanos a la unidad indican que la expresión del gen es normal (Livak *et al.*, 2001) y que no se ven alterados. La expresión de la IL-1 β en la toma 1 fue de 1.22 y en la toma 2 de 1.15, la expresión del grupo control fue de 1.18. La expresión de la IL-6 en la toma 1 fue de 1.52 y en la toma 2 de 1.99, la expresión del grupo control fue de 1.19. En cuanto a la expresión del TNF- α en la toma 1 fue de 1.27 y en la toma 2 de 2.97, la expresión del grupo control fue de 1.26, aparentemente el TNF- α está sobre expresado 1.71 veces (si se toma en cuenta el valor basal), sin embargo, al realizar el análisis por medio de la Prueba t de las citocinas proinflamatorias en el grupo leve-moderado, la expresión no tuvo una diferencia significativa ($p=0.26$) entre la toma 1 y la toma 2. Por lo tanto, se puede decir que las citocinas proinflamatorias no están sobre expresadas en el grupo de pacientes con COVID-19 leve-moderado. Después de que inician los síntomas, aproximadamente entre los 7 y 14 días empieza un aumento significativo de citocinas y mediadores inflamatorios que se conoce como “tormenta de citoquinas”, que como se ha visto, se caracteriza por niveles muy incrementados de interleucinas (principalmente IL-1 β , IL-6, IL-2, IL-7, factor estimulante de colonias de granulocitos, interferón- γ 10 y TNF- α) (Espinoza, *et.al.* 2020), el comportamiento observado no fue un aumento de la expresión de estas citocinas como se reportó, esto se debe a que en los pacientes con COVID-19 leve o moderado la enfermedad se va resolviendo gracias al buen funcionamiento del sistema inmunológico, que contribuye además con la disminución de la carga viral y en este caso, la expresión de citocinas “normal” acorde al grado de la enfermedad. No se han reportado valores elevados de citocinas proinflamatorias en pacientes con el curso de la enfermedad leve.

GRUPO COVID-19 GRAVE

En la siguiente fase de la enfermedad COVID-19 (fase 2) existe ya una afectación pulmonar y ocurre entre los días 7-10 después del inicio de los síntomas generalmente los pacientes desarrollan una neumonía viral, con tos, fiebre y posiblemente hipoxia, los análisis de sangre revelan un aumento de la linfopenia, junto a una elevación leve de marcadores de inflamación sistémica por lo que es necesaria la hospitalización para una observación y tratamiento más cercano (De Francisco *et al.*, 2020). De acuerdo a lo reportado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020)

la carga viral de puede continuar siendo alta durante esta fase y disminuir después del día 11-14 (figura 5.) conforme se va “resolviendo” la enfermedad. Es aquí donde, dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el paciente, la evolución será favorable o avanzara a la siguiente fase. Se puede considerar a los pacientes del grupo grave de este estudio en esta fase. El comportamiento de la carga viral fue variado en cada uno de los pacientes ya que se observó casos de disminución y casos de aumento de la carga viral entre la toma 1 y la toma 2. En promedio la primera toma se realizó (en este grupo) a los 8 (± 5) días después del inicio de los síntomas, en este momento y de acuerdo a lo reportado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020), la carga viral es alta y debería permanecer constante los días siguientes hasta cerca del día 12 donde se observaría una disminución; la toma 2 se realizó en promedio 14 (± 5) días después del inicio de los síntomas y el comportamiento de la carga viral, como se observa en el grafico 13, fue una disminución, lo que concuerda con lo que se ha reportado, es decir, que para el día 12 en adelante la carga viral debería disminuir. El promedio de la carga viral en la primera toma fue de 366,742.13 copias/ μ L y para la segunda toma el promedio fue de 223,475.30 copias/ μ L, hubo una ligera disminución de la carga viral pero no fue significativa ($p=0.55$), esto nos dice que la carga viral efectivamente disminuye, pero sigue permaneciendo alta en la toma 2 en comparación al grupo leve-moderado.

Comportamiento de la Carga Viral en COVID-19 Grave

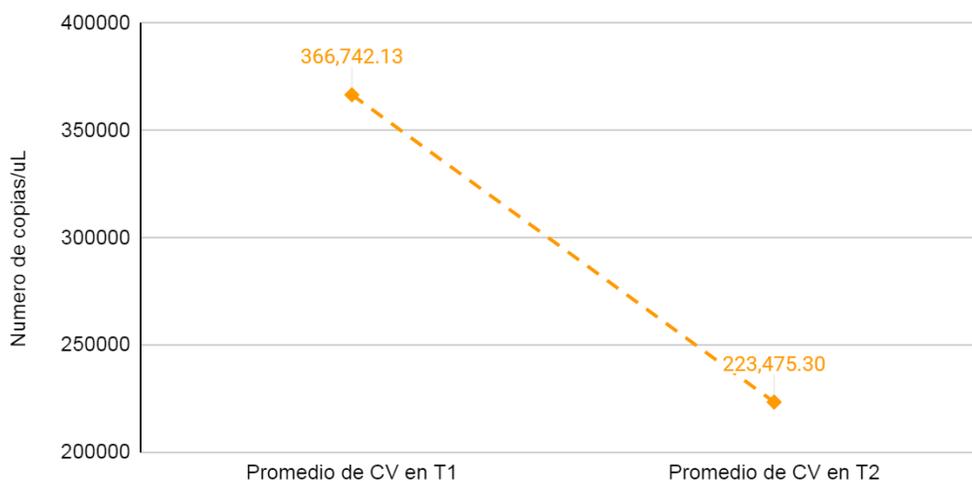


Gráfico 18. Comportamiento de la Carga viral en pacientes con COVID-19 Grave. El promedio de la carga viral en la primera toma fue de 366,742.13 copias/ μ L y para la segunda toma el promedio fue de 223,475.30 copias/ μ L, hubo una ligera disminución de la carga viral pero no fue significativa ($p=0.55$)

Se observaron 3 casos particulares de pacientes en los que el comportamiento de la carga viral fue en aumento. Uno de estos pacientes tuvo una carga viral de 101,100 copias/ μ L en la toma 1 (en muestra de exudado nasofaríngeo) y para la segunda toma la carga viral aumento hasta 105,100 (en muestra de expectoración), las comorbilidades reportadas eran diabetes e hipertensión, los dos pacientes más en los que se observó un aumento de la carga viral no tenían comorbilidades conocidas y el aumento de la carga viral fue de 83.72% y 73.76% respectivamente.

Respecto a la expresión de las citocinas proinflamatorias, al igual que en el grupo leve-moderado, al realizar el análisis por medio de la Prueba t de las citocinas proinflamatorias, la expresión no tuvo una diferencia significativa ($p=0.4$) entre la toma 1 y la toma 2. La expresión de la IL-1 β en la toma 1 fue de 1.82 y en la toma 2 de 4.23, la expresión del grupo control fue de 1.18. La expresión de la IL-6 en la toma 1 fue de 1.72 y en la toma 2 de 1.6, la expresión del grupo control fue de 1.19. En cuanto a la expresión del TNF- α en la toma 1 fue de 1.21 y en la toma 2 de 1.3, la expresión del grupo control fue de 1.26, se puede observar que aparentemente la IL-1 β está sobre expresado 3.05 veces (si se toma en cuenta el valor basal), sin embargo, como ya se mencionó, la diferencia no es significativa. En los casos particulares donde se observó un aumento en la carga viral, únicamente uno de los pacientes tuvo una expresión más elevada de la IL-1 β tanto en la Toma 1 (7.52 veces) como en la Toma 2 (17.17 veces). Por lo tanto, se puede decir que el síndrome de tormenta de citocinas tampoco se observó en el grupo grave, ya que la elevación de una sola citocina no es predisposición para padecer una tormenta de citocinas. Se sabe que la IL-1 β junto con el TNF- α son los encargados de iniciar la cascada de citocinas (Castrillón, *et al.* 2007) y la IL-1 a su vez de aumentar la expresión de la IL-6 (Jiang, *et al.*, 2006) por lo que es indispensable que las 3 citocinas estén elevadas para considerar que el paciente está cursando por el síndrome de tormenta de citocinas.

GRUPO COVID-19 CRITICO

La última fase de la enfermedad COVID-19 es la fase 3, en la cual existe inflamación sistémica extrapulmonar, es la etapa más grave de la enfermedad, que se manifiesta como un síndrome de hiperinflamación sistémica extrapulmonar (De Francisco *et al.*, 2020). Se ha reportado que solo un bajo porcentaje (5% de acuerdo con la OMS, 2021) de pacientes evolucionara de manera más crítica pasando a esta la tercera fase, la que se caracteriza por la elevación de los marcadores como la IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), la PCR, la ferritina y el dímero-D, entre otros (De Francisco *et al.*, 2020). Durante esa fase y de acuerdo con el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020) la carga viral puede continuar siendo alta hasta después del día 20 (figura 5) siendo hasta 60 veces mayor que las que tienen un curso más leve (Liu, 2020). Esta es una etapa crítica ya que se puede presentar desde un síndrome hemofagocítico, shock, vasoplejia, insuficiencia respiratoria hasta una falla multiorgánica con afectación sistémica, incluida miocarditis, por lo que, en general, el pronóstico es grave y la recuperación es más difícil.

El grupo critico de este estudio pertenece a esta fase de la enfermedad COVID-19. El comportamiento de la carga viral al igual que en el grupo grave, fue variado en cada uno de los pacientes: se observó casos de disminución y casos de aumento de la carga viral entre la toma 1 y la toma 2. En promedio la primera toma se realizó (en este grupo) a los 6 (\pm 4) días después del inicio de los síntomas, en este momento y de acuerdo a lo reportado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020), la carga viral es alta y debería permanecer constante los días siguientes sin disminución; la toma 2 se realizó en promedio 11 (\pm 4) días después del inicio de los síntomas y el comportamiento de la carga viral, como se observa en el grafico 15, fue un aumento, lo que concuerda con lo que se ha reportado, es decir, que para el día 11 en adelante la carga viral en los pacientes con COVID-19 grave es constante y no disminuye considerablemente como en los pacientes leve-moderado o los graves. Cabe destacar que la evolución de estos pacientes fue en promedio de 18 (\pm 6) días desde el inicio de los síntomas hasta la defunción. El promedio de la carga viral en la primera toma fue de 21,372,048 copias/ μ L y para la segunda toma el

promedio fue de 119,277,626 copias/ μ L, como ya se mencionó, hubo un aumento en la carga viral, sin embargo, no fue significativo ($p=0.38$).

Comportamiento de la Carga Viral en COVID-19 Critico

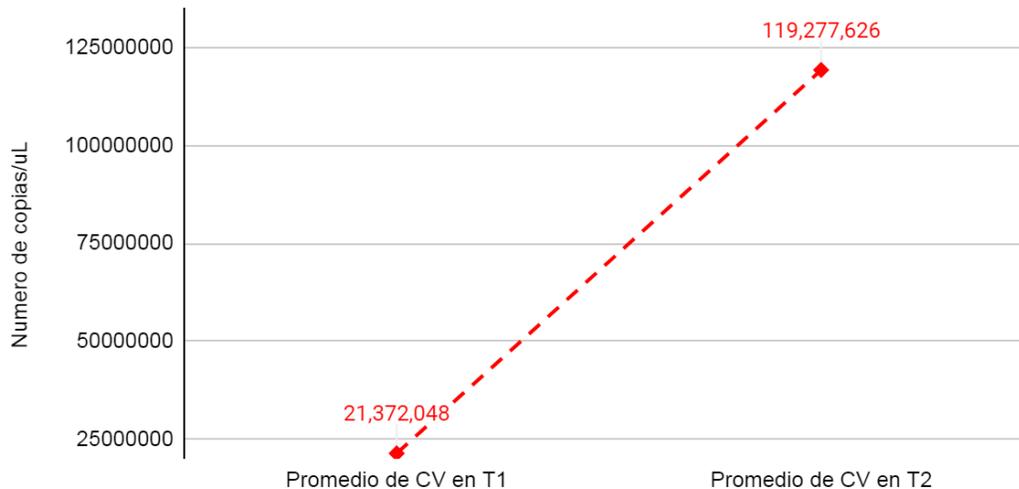


Gráfico 19. Comportamiento de la Carga viral en pacientes con COVID-19 Critico. El promedio de la carga viral en la primera toma fue de 21,372,048 copias/ μ L y para la segunda toma el promedio fue de 119,277,626 copias/ μ L, no hubo disminución de la carga viral, hubo un aumento en la carga viral, sin embargo, no fue significativo ($p=0.38$).

Solo en dos pacientes de este grupo se observó un aumento de la carga viral, uno en particular tuvo una carga viral en la primera toma (en muestra de exudado nasofaríngeo) de 65,520,000 copias/ μ L y para la segunda toma (en muestra de expectoración) aumento hasta 1,107,000,000 copias/ μ L, la expectoración es un líquido espeso producido en los pulmones y en las vías respiratorias que llegan a los pulmones (Husney *et al.*, 2020), es decir, del órgano blanco del virus SARS-CoV-2, por lo que es más probable encontrar una gran cantidad de virus en una muestra de esputo que en un exudado nasofaríngeo. El otro paciente tuvo un aumento del 83.09% en la carga viral de la toma 1 a la toma 2. Ambos pacientes padecían diabetes. El resto de los pacientes de este grupo presentaron una disminución en la carga viral. Estos valores difieren en lo reportado por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020), ya que la carga viral no se mantuvo constante en todos los pacientes, sin embargo, si se mantuvo más alta en comparación con el grupo leve-moderado. Silva, *et al.* (2020) sugieren que la forma proinflamatoria observada en COVID-19 grave puede estar impulsada por cargas virales más altas. Además, revelan

un modelo inmunológico asociado con cargas virales más bajas, menor gravedad y mortalidad. En su estudio los pacientes que sobrevivieron mostraron una disminución constante y significativa de la carga viral con el tiempo, mientras que aquellos con enfermedad fatal no pudieron controlar la carga viral de saliva y/o exudado nasofaríngeo, esto fue similar a lo que se encontró en los pacientes de este estudio.

En relación con a la expresión de las citocinas proinflamatorias, al realizar el análisis por medio de la Prueba t de las citocinas proinflamatorias, la expresión no tuvo una diferencia significativa ($p=0.8$) entre la toma 1 y la toma 2. La expresión de la IL-1 β en la toma 1 fue de 2.21 y en la toma 2 de 3.04, la expresión del grupo control fue de 1.18. La expresión de la IL-6 en la toma 1 fue de 1.32 y en la toma 2 de 1.53, la expresión del grupo control fue de 1.19. La expresión del TNF- α en la toma 1 fue de 3.19 y en la toma 2 de 2.49, la expresión del grupo control fue de 1.26, se puede observar que aparentemente la IL-1 β está sobre expresado 1.86 veces (si se toma en cuenta el valor basal) así como el TNF- α que estaría sobre expresado 1.93 veces si se toma en cuenta el valor basal, sin embargo, como ya se mencionó, la diferencia no es significativa.

En los casos especiales donde la carga viral aumento únicamente en un paciente se observó una alteración en los valores de expresión del gen TNF- α hay que en la toma 1 el valor fue de 2.08 y en la toma 2 fue de 11.72, sin embargo, los valores de las otras citocinas fueron “normales”. Los niveles de expresión de citocinas informados en estudios de pacientes con COVID-19, aunque aumentaron en individuos con enfermedades graves, están elevados solo marginalmente, menos del doble por encima de los observados en sujetos no críticamente enfermos (Mudd et al., 2020), por lo que se puede decir que en el grupo de pacientes críticos tampoco se presentó un evento de tormenta de citocinas, es probable que los pacientes hayan fallecido debido a otras complicaciones que también se han observado como trombosis, paros cardio-respiratorios, infecciones bacterianas, etc. Es destacable que una de las probables razones por las que no se observó una sobre expresión de las citocinas es debido al manejo y tratamiento oportuno dado por los médicos.

Al comprar los valores de la expresión de los genes estudiados de los grupos de estudio con COVID-19 por cada toma, por medio de la prueba t, ninguno de los genes tuvo una diferencia significativa ni al realizar la comparación con los valores de expresión del grupo control ya que los valores de expresión de las citocinas en el grupo control fue muy similar, en la mayoría de los casos, a los valores de expresión de los grupos de estudio con COVID-19 como se puede observar en el gráfico 20, y al realizar el análisis ANOVA de todos los valores de expresión de los genes estudiados tampoco se observó una diferencia significativa entre los valores de la toma 1 y la toma 2 ($p= 0.22$), sin embargo al comparar los valores de los genes estudiados en los grupos de estudio con los valores de expresión normal del grupo control si se observan más elevados en la toma 2, sin embargo, al ser pacientes sanos (grupo control) no se puede realizar una comparación real de la evolución de la expresión de las citocinas a lo largo de la enfermedad, por lo que se pueden tomar como valores normales y no como valores comparativos directos. Además, no hay una elevación significativa de las 3 citocinas en los pacientes con COVID-19 en ninguno de los grupos de estudio, y los casos en los que se eleva son aislados y no se observa una elevación en todas las citocinas sino solo en una por lo que se puede decir que en los pacientes estudiados no se presentó el fenómeno de tormenta de citocinas como algunos investigadores han reportado.

Es necesario continuar con las investigaciones sobre la enfermedad COVID-19 para entender mejor la patogenia que, hasta el momento, como se ha observado, es una enfermedad con un espectro de signos y síntomas muy heterogéneo, lo que hace más complicado dar datos generales sobre esta, ya que se ha visto que actúa de manera muy diferente en cada paciente y su gravedad depende de muchos factores y no únicamente de la carga viral u otros parámetros como la expresión de ciertas citocinas.

Expresión Relativa de Citocinas Pro-inflamatorias en COVID-19

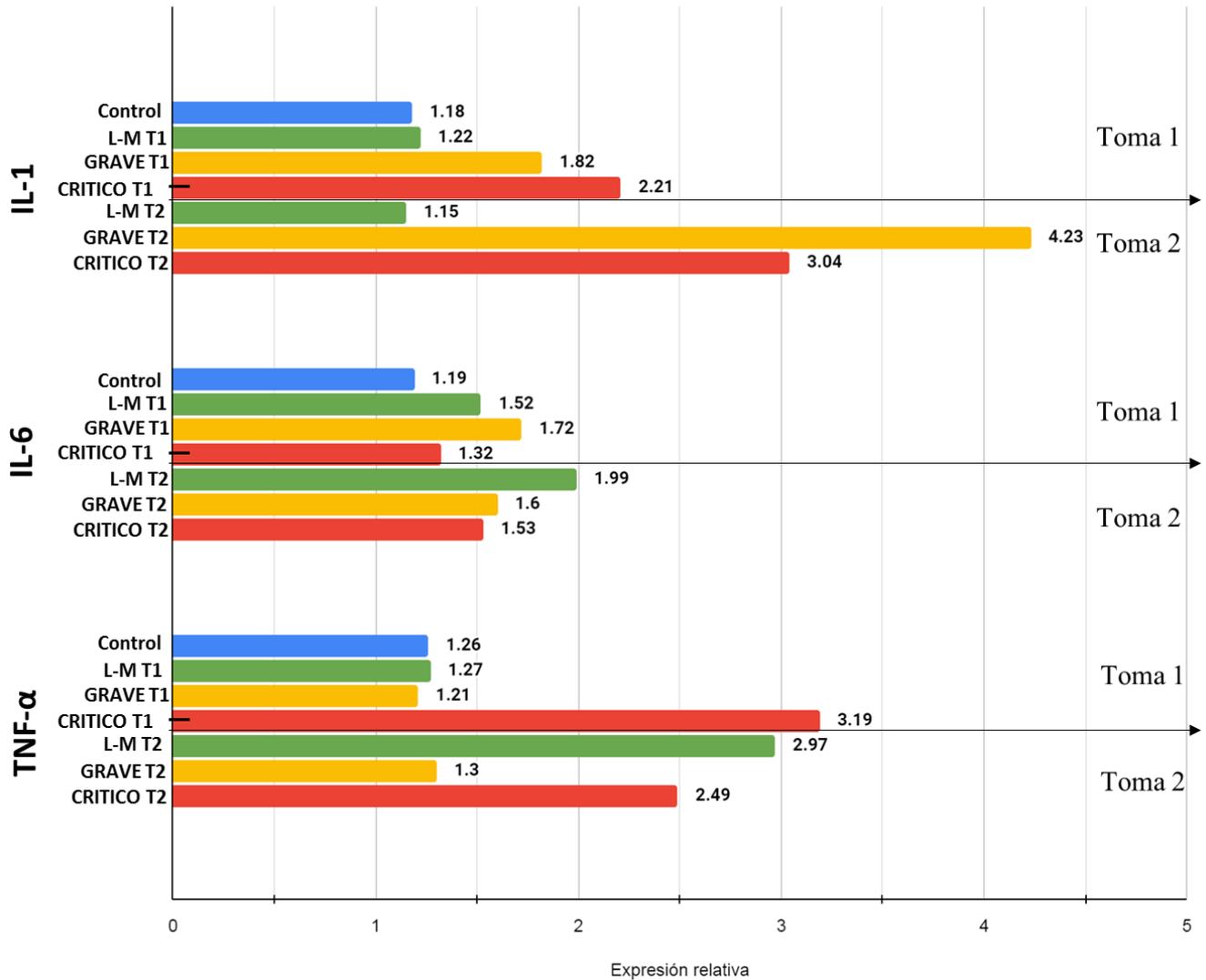


Gráfico 20. Expresión relativa de las citocinas proinflamatorias en cada uno de los grupos de estudio incluido en control. Al realizar el análisis de varianza los resultados no tuvieron una diferencia significativa entre la toma 1 y la toma dos ($p=0.22$) de ninguno de los genes.

X. CONCLUSIONES

Es cierto que se ha reportado que la tormenta de citocinas es una de las causas de muerte en los pacientes con COVID-19 crítico, sin embargo no es una causa común en todos los pacientes ya que en este estudio no se observó la sobre expresión de las citocinas proinflamatorias (encargadas de comenzar la cascada de citocinas) tal como lo que se había reportado en otros estudios; de igual manera tampoco se observó una asociación de la carga viral con la gravedad de la enfermedad, en la mayoría de los casos hubo una disminución importante de la carga viral y los casos en los que se mantuvo constante fueron mínimos. Por lo tanto, la gravedad de la enfermedad no se relaciona con la carga viral alta ni con la expresión de las citocinas proinflamatorias, sino que, depende de muchos factores que juntos pueden desencadenar un desenlace fatal, es decir, es consecuencia de la suma de muchos elementos como las complicaciones adquiridas por el tiempo de hospitalización, la presencia de comorbilidades preexistentes, la edad, en los casos más críticos el uso de ventilador mecánico, etc. Es necesario aumentar el número de pacientes para futuros estudios, ya que el tamaño de la muestra de este reporte no es representativo de todos los casos que se han presentado a lo largo de la pandemia, los datos encontrados fueron exclusivos de los pacientes de este estudio, por lo que pueden no ser los mismos que otras poblaciones estudiadas.

REFERENCIAS

- Abduljalil, J.M., Abduljalil B.M. (2020) *Epidemiology, genome, and clinical features of the pandemic SARS-CoV-2: a recent view*. *New Microbes New Infect.* 35: p. 100672. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100672
- Aguilera, P., Ruiz, M., Rocha, M. G., Pineda, B., & Chánez, M. E. (s. f.). *PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. Pg. 175-201. Recuperado de: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>
- Alcántara P., Aldecoa S., Canals M. Laura Carbajo. Fernández A., Martín R., Martínez M., Párraga I., Pérez A., Redondo J., Rotaeche R., Sempere M. y Tranche S. (2021) *Abordaje del paciente con COVID-19 en atención primaria*. Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria. Recuperado de: <https://www.semefyc.es/wp-content/uploads/2021/01/Covid19-abordaje.pdf>
- ALM de Francisco, JL Pérez Canga (2020). *Coronavirus y Riñón*. *Nefrología al día*. Recuperado de: <https://www.nefrologiaaldia.org/305>.
- Amber D. (2020) *Coronavirus y sistema inmunológico: qué es la tormenta de citocinas que sufren algunos pacientes graves de COVID-19*. *Knowable Magazine*. BBC. Recuperado de: <https://www.bbc.com/mundo/vert-fut-52603077>
- Banco de Sangre del Instituto Nacional de Cardiología (2021) *Banco de Sangre: Donación*. Gobierno de México. Recuperado de: https://www.cardiologia.org.mx/atencion_medica/banco_de_sangre/
- Boncrisiani, H. F., Criado, M. F., & Arruda, E. (2009). *Respiratory Viruses*. *Encyclopedia of Microbiology*, 500–518. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00314-X>
- Cañelles López, M., Eugenia Campillo, N., & Jiménez Sarmiento, M. M. (2021, 1 abril). *Coronavirus: 3 datos que explican por qué la covid-19 afecta de manera diferente a hombres y mujeres*. BBC News Mundo. <https://www.bbc.com/mundo/noticias-56589039>
- Cascella, M., et al. (2020) *Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19)*, in *StatPearls: Treasure Island (FL)*. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32150360/>
- Castrillón Rivera, L. E., Macín Cabrera, S. A., & Palma Ramos, A. (2007). *Participación de la interleucina 1β (IL-1β) en periodontitis*. *Revista Odontológica Mexicana*, 11(4), 185-200. <https://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2007/uo074e.pdf>

- CDC (2021) COVID-19. *Adultos mayores. Centro Nacional de Vacunación y Enfermedades Respiratorias (NCIRD), División de Enfermedades Virales.* Recuperado de: <https://espanol.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/older-adults.html>
- Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (2020) *Información científica-técnica. Enfermedad por coronavirus, COVID-19.* Ministerio de Sanidad. España. Recuperado de: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/IT Coronavirus.pdf>
- Cevik Muge *et al.* (2020). *Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2.* BMJ 2020; 371. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.m3862>
- Checa Rojas, A. (2018). *Aislamiento de ARNm y síntesis de ADNc.* Conogasi. Recuperado de: <http://conogasi.org/articulos/aislamiento-de-arnm-y-sintesis-de-adnc/>
- Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, *et al.* (2020) *Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study.* Lancet. 395:507–13. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30211-7
- Coperchini F, Chiovato L, *et al.* (2020) *The cytokine storm in COVID-19: an overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system.* Cytokine Growth Factor Rev. 53:25–32. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2020.05.003
- De La Fuente A., Romero C., Danitza X., Cárdenas A., Álvarez M. (2018) *Diseño y evaluación de primers in silico del gen E1 del virus de chikungunya para Real-Time PCR (qPCR).* REVISTA CONCIENCIA N°1/VOL.6: 107-124. ISSN: 2310-0265. Recuperado de http://www.scielo.org.bo/pdf/rcfb/v6n1/v6n1_a11.pdf
- Del Valle, D. M., Kim-Schulze, S., Huang, H. H., Beckmann, N. D., Nirenberg, S., Wang, B., Lavin, Y., Swartz, T. H., Madduri, D., Stock, A., Marron, T. U., Xie, H., Patel, M., Tuballes, K., Van Oekelen, O., Rahman, A., Kovatch, P., Aberg, J. A., Schadt, E., . . . Gnjjatic, S. (2020). An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nature Medicine*, 26(10), 1636–1643. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>
- Elizalde González J.J., Fortuna Custodio J. A., Luviano García J.A. *et. al.* (2020) *Guía COVID-19 para la atención del paciente crítico con infección por SARS-CoV-2 Colegio Mexicano de Medicina Crítica.* Med Crit; 34(1):7-42. DOI: 10.35366/93279
- Espinoza C. G. I., Granja Moran M., Heredia Fuenmayor M., *et al.*, (2020). *Consenso de recomendaciones de hematología sobre el tratamiento de COVID19.* MTT2- NACIONAL.

- ECUADOR. MTT2-PRT-0022. Recuperado de: <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/07/2.0-Conseso-de-recomendaciones-de-Hematolog%C3%ADa-sobre-el-tratamiento-de-COVID-19-1.pdf>
- Falfán Valencia R. (2002) *Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neumopatías intersticiales*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex Volumen 15 - número 1. Págs. 48-53. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2002/in021h.pdf>
- Fernández-Rúa, J. M. (2020). *Nuevo mapa genético del SARS-CoV-2*. Biotech Magazine & News. Recuperado de: <https://biotechmagazineandnews.com/nuevo-mapa-genetico-del-sars-cov-2/#:%7E:text=Al%20ser%20un%20virus%20de,picos%2C%20envolturas%2C%20etc>
- Florencia Prieto, M., Kilstein, J., Bagilet, D., & Maris Pezzotto, S. (2008). *Proteína C reactiva como factor pronóstico de mortalidad en la unidad de cuidados intensivos*. Medicina Intensiva, 32(9), 424–430. [https://doi.org/10.1016/s0210-5691\(08\)75719-x](https://doi.org/10.1016/s0210-5691(08)75719-x)
- Flores M. (2020) *Coronavirus: ¿cómo ataca el virus al cuerpo humano?* Agencia Andina. Agencia Peruana de Noticias. Recuperado de: <https://andina.pe/agencia/inicio>
- Fundación iO. (2020, 19 noviembre). *El valor del CT en la PCR de covid-19*. Recuperado de: <https://fundacionio.com/el-valor-del-ct-en-la-pcr-de-covid-19/>
- González Hita M., Bastidas Ramírez B.E., Ruiz Madrigal B., Godínez S., Panderero A. *Funciones endocrinas de la célula adiposa*. Rev Endocrinol Nutr. 2002; 10: 140-146. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/endoc/er-2002/er023g.pdf>
- Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., et al. (2020) *Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China*. N Engl J Med. 382:1708-1720. DOI: 10.1056/NEJMoa2002032
- Hoffmann Christian y Kamps Bernd Sebastian (2021). *COVID Reference*. Sixth Edition 2021.6 CR 2021.6.07, Copy-Editor: Rob Camp. Recuperado de: https://covidreference.com/clinical_es
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. (2020) *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. Lancet. 395:497–506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5
- Husney, A., Thompson, G., & Cowie, R. (2020, septiembre). Cultivo de esputo. Cigna. Recuperado de: <https://www.cigna.com/es-us/individuals-families/health-wellness/hw/pruebas-mdicas/cultivo-de-esputo-hw5693>
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2019) *Requisitos mínimos para donar sangre*. Gobierno de México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/imss/articulos/requisitos-minimos-para-donar-sangre>

- J. Reina. (2020) *The SARS-CoV-2, a new pandemic zoonosis that threatens the world*. Vacunas. Vol. 21. Núm. 1 p.17-22. DOI: 10.1016/j.vacun.2020.03.001
- K. Jiang, Y. Chen, J. Jarvis (2006) *hCG Secretion in human choriocarcinoma JAR cells is MAPK but not Stat3 dependent: contributions of TNF-alpha and IL-1 beta to inflammation-induced hCG secretion*. Placenta, 27 pp. 853-860 <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2005.04.013>
- Labclinics (2020) *Tormenta de citoquinas en enfermedad de COVID-19*. COVID-19, Multiplex. Recuperado de: <https://www.labclinics.com/tormenta-de-citoquinas-en-enfermedad-de-covid-19/>
- Lee, P.I., et al. (2020) *Are children less susceptible to COVID-19?* J Microbiol Immunol Infect. 53(3): p. 371-372. DOI: 10.1016/j.jmii.2020.02.011
- Leonard H. (2020) *Tormenta de citocinas y las perspectivas de la inmunoterapia con COVID-19*. Cleveland Clinic Journal of Medicine. 87 (7) 389-393; <https://doi.org/10.3949/ccjm.87a.ccc008>
- Li, B., Yang, J., Zhao, F. et al. (2020) *Prevalence and impact of cardiovascular metabolic diseases on COVID-19 in China*. Clin Res Cardiol 109, 531–538 <https://doi.org/10.1007/s00392-020-01626-9>
- Liu Y, Yan L-M, Wan L, Xiang T-X, Le A, Liu J-M, et al. (2020) *Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19*. Lancet Infect Dis. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30232-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30232-2)
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López P. G., Ramírez S. M. y Torres A. M. (2020) *Participantes de la respuesta inmunológica ante la infección por SARS-CoV-2*. Alergia, Asma e Inmunología pediátrica. Vol. 29, Núm. 1. pp 5-15. <https://dx.doi.org/10.35366/93321>
- Lozada Requena I. et al. (2020) *COVID-19: respuesta inmune y perspectivas terapéuticas*. Rev. perú. med. exp. salud pública vol.37 no.2 Lima. <http://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2020.372.5490>
- Mehta, P., et al. (2020) *COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression*. Lancet. 395(10229): p. 1033-1034. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
- Merino, R. J. (2002) *Utilidad diagnóstica de la velocidad de sedimentación globular*. Elsevier. Vol. 39. Núm. 7. páginas 325-329. Recuperado de: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-utilidad-diagnostica-velocidad-sedimentacion-globular-13029997>

- Montes C. (2020) *Coronavirus: ¿Cuántos pacientes conectados a un ventilador logran sobrevivir?* La Tercera, innovación digital. Grupo Copesa. Recuperado de: <https://www.latercera.com/que-pasa/noticia/coronavirus-cuantos-pacientes-conectados-a-un-ventilador-logran-sobrevivir/2JBXYO26RNHLNJIBV3IUL4TN6/>
- Mudd, P. A., Crawford, J. C., Turner, J. S., Souquette, A., Reynolds, D., Bender, D., Bosanquet, J. P., Anand, N. J., Striker, D. A., Martin, R. S., Boon, A. C. M., House, S. L., Remy, K. E., Hotchkiss, R. S., Presti, R. M., O'Halloran, J. A., Powderly, W. G., Thomas, P. G., & Ellebedy, A. H. (2020). *Distinct inflammatory profiles distinguish COVID-19 from influenza with limited contributions from cytokine storm*. *Science Advances*, 6(50), eabe3024. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe3024>
- Mulchandani, R., Lyngdoh, T., & Kakkar, A. K. (2021). *Deciphering the COVID-19 cytokine storm: Systematic review and meta-analysis*. *European journal of clinical investigation*, 51(1), e13429. <https://doi.org/10.1111/eci.13429>
- Muñoz Torres, A. V., & Moreno Altamirano, A. (2021). *COVID-19: panorama epidemiológico a un año del inicio de la epidemia en México*. *Boletín COVID-19 Salud Pública*, 2(16), 15–18. Recuperado de: <http://dsp.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2013/12/COVID-19-No.16-07-COVID-19-panorama-epidemiol%C3%B3gico-a-un-a%C3%B1o-del-inicio-de-la-epidemia-en-M%C3%A9xico.pdf>
- Nava Valdivia, C., Ponce-Guarneros, J., Echeverría González, G., Anaya Ambriz, E., Rubio Castro, J., Torres Monarrez, A., Muñoz Montes de Oca, D., & Cruz López, G. (2020). *Infecciones asociadas al uso de fármacos anti-TNF en enfermedades reumáticas*. *El Residente*, 15(1), 12–18. <https://doi.org/10.35366/94038>
- NCBI. (2021, 11 julio). *GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* [Homo sapiens (human)]. Gene – NCBI: Gene ID: 2597. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597>
- OMS (2018). *Virus de la gripe aviar y otros virus de la gripe de origen zoonótico*. Recuperado de: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(avian-and-other-zoonotic\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(avian-and-other-zoonotic))
- OMS (2020). *Manejo clínico de la COVID-19*. Organización Mundial de la Salud 2020. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332638/WHO-2019-nCoV-clinical-2020.5-spa.pdf>
- OMS (2021). *Manejo clínico de la COVID-19*. Orientaciones evolutivas. Organización Mundial de la Salud 2021. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/340629/WHO-2019-nCoV-clinical-2021.1-spa.pdf>

- PAHO (2021). *Epidemiological Update: Coronavirus disease (COVID-19)*. Pan American Health Organization. Recuperado de: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53381>
- Parra Izquierdo V., Flórez-Sarmiento C., Romero-Sánchez C. (2020) *Inducción de “tormenta de citocinas” en pacientes infectados con SARS- CoV-2 y desarrollo de COVID-19. ¿Tiene el tracto gastrointestinal alguna relación en la gravedad?* Rev Colomb Gastroenterol. Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología. 35 (Supl 1): <https://doi.org/10.22516/25007440.539>
- Pelaia, C., Tinello, C., Vatrella, A., y Sarro, G. (2020). *Lung under attack by COVID-19- induced cytokine storm : pathogenic mechanisms and therapeutic implications.* 1–9. <https://doi.org/10.1177/1753466620933508>
- Pérez A., Manuel R., Gómez T. J., & Dieguez G.R. (2020). *Características clínico-epidemiológicas de la COVID-19*. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 19(2), e3254. Epub 22 de abril de 2020. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2020000200005&lng=es&tlng=es.
- Plitt L. (2020) *Coronavirus: las teorías de por qué la COVID-19 puede llegar a causar la muerte de pacientes jóvenes y aparentemente sanos*. BBC News Mundo. Recuperado de: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-52326745>
- Racaniello Vincent (2009) *Viruses and the respiratory tract. Virology blog. About viruses and viral disease*. Disponible en: <https://www.virology.ws/2009/05/21/viruses-and-the-respiratory-tract/>
- Robinson, P. C., Liew, D. F., Liew, J. W., Monaco, C., Richards, D., Shivakumar, S., Tanner, H. L., & Feldmann, M. (2020). *The Potential for Repurposing Anti-TNF as a Therapy for the Treatment of COVID-19*. Med, 1(1), 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2020.11.005>
- Rocha, J. A. (2020, 4 diciembre). *¿Cuáles son los factores de comorbilidad detrás del alto número de muertes en México por COVID-19?* Anadolu Agency. Recuperado de: <https://www.aa.com.tr/es/mundo/-cu%C3%A1les-son-los-factores-de-comorbilidad-detr%C3%A1s-del-alto-n%C3%BAmero-de-muertes-en-m%C3%A9xico-por-covid-19/2065134>
- Rodríguez A., Ruiz Botella M., Loeches I.M., Jiménez Herrera M. et. al. (2021) *Deploying unsupervised clustering analysis to derive clinical phenotypes and risk factors associated with mortality risk in 2,022 critically ill patients with COVID-19 in Spain*. Critical Care Journal. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-125422/v2>

- Rodriguez, Y., et al., (2020) *Autoinflammatory and autoimmune conditions at the crossroad of COVID-19*. J Autoimmun. p. 102506. DOI: 10.1016/j.jaut.2020.102506
- Rowaiye, A. B., Okpalefe, O. A., Onuh Adejoke, O., Ogidigo, J. O., Hannah Oladipo, O., Ogu, A. C., Oli, A. N., Olofinsae, S., Onyekwere, O., Rabi Abubakar, A., Jahan, D., Islam, S., Dutta, S., & Haque, M. (2021). *Attenuating the Effects of Novel COVID-19 (SARS-CoV-2) Infection-Induced Cytokine Storm and the Implications*. Journal of Inflammation Research, Volume 14, 1487–1510. <https://doi.org/10.2147/jir.s301784>
- Saavedra Ramírez, P. G., Vásquez Duque, G. M., & González Naranjo, L. A. (2011). *Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico*. Rev. IATREIA, 24(2), 157–166. <http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v24n2/v24n2a05.pdf>
- Salika M., David R. (2020) *Respiratory Viruses*. ARUP Consult®. Recuperado de: <https://arupconsult.com/content/respiratory-viruses>
- Sánchez Zúñiga M.J. et al. (2020) *Coronavirus-2019. Consideraciones Generales*. Revista Mexicana de Anestesiología. Vol. 43. No. 2. pp 83-91. 92866 <https://dx.doi.org/10.35366/92866>
- Serrano Castro P.J. et al. (2020) *Impact of SARS-CoV-2 infection on neurodegenerative and neuropsychiatric diseases: A delayed pandemic?* Neurología. Volume 35, Issue 4, May 2020, Pages 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.04.002> Get rights and content
- Shi, S., Qin, M., Shen, B., Cai, Y., Liu, T., Yang, F., Gong W, Liu X, Liang J, Zhao Q, Huang H, Yang B., et. al. (2020). *Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China*. JAMA cardiology, 5(7), 802–810. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.0950>
- Silva J., Lucas C., Sundaram M., Israelow B., Wong P., Klein J. et. al. (2021) *Saliva viral load is a dynamic unifying correlate of COVID-19 severity and mortality*. medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.01.04.21249236>
- Singh A.K., Gupta R., et al. (2020) *Diabetes in COVID-19: Prevalence, pathophysiology, prognosis and practical considerations*. Diabetes Metab Syndr., 14, pp. 303-310 <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.004>
- Sládková, T & Kostolansky, Frantisek. (2006). *The role of cytokines in the immune response to Influenza A virus infection*. Acta virologica. 50. 151-62. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17131933/>

- Solano-Luna, L. M., Chavarro-Mesa, E., & Ángel-Díaz, J. E. (2018). PCR cuantitativa para la detección del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. *Ciencia y Agricultura*, 15(1), 7–18. <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.n1.2018.7789>
- Sosa García, J. (2020). *Atención de pacientes con COVID-19 en el consultorio médico*. *Revista CONAMED*, 25(S1), 4–14. <https://doi.org/10.35366/97343>
- Su Eun Park (2020) *Epidemiology, virology, and clinical features of severe acute respiratory syndrome - coronavirus-2 (SARS-CoV-2; Coronavirus Disease-19)*. Vol. 63, No. 4, 119–124, <https://doi.org/10.3345/cep.2020.00493>
- Tamay de Dios L., Ibarra C. y Velasquillo C. (2013) *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. *Investigación en Discapacidad*. Vol. 2, Núm. 2 pp. 70-78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D. H., Holbrook, M. G., Gamble, A., Williamson, B. N., Tamin, A., Harcourt, J. L., Thornburg, N. J., Gerber, S. I., Lloyd-Smith, J. O., de Wit, E., & Munster, V. J. (2020). *Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1*. *New England Journal of Medicine*, 382(16), 1564–1567. <https://doi.org/10.1056/nejmc2004973>
- Vargas Salazar, M. A. (2009). *El Factor de Necrosis Tumoral-alfa (FNT- α) en la patogénesis de la artritis reumatoide y el riesgo de tuberculosis con Infliximab (un agente anti-fnt- α)*. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, LXVII (590), 345–351. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/590/art4.pdf>
- Wölfel R., Corman V.M., Guggemos W. et al. (2020) *Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019*. *Nature* volume 581, pages465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
- Wu, C., Chen, X., Cai, Y., Xia, J., Zhou, X., et. al. (2020). *Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China*. *JAMA internal medicine*, 180(7), 934–943. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2020.0994>
- Yang, X., Yu, Y., Xu, J., Shu, H., Xia, J., Liu, H., Wu, Y., Zhang, L., Yu, Z., Fang, M., Yu, T., Wang, Y., Pan, S., Zou, X., Yuan, S., & Shang, Y. (2020). *Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study*. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(5), 475–481. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(20\)30079-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30079-5)

Zheng, J.(2020) *SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat*. Int J Biol Sci. 16(10): p. 1678-1685. DOI: 10.7150/ijbs.45053

Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Zhang, Y., Chen, H., & Cao, B. et. al. (2020). *Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study*. Lancet (London, England), 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)

Zou L., Ruan F., Huang M. et al. (2020) SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients. N Engl J Med; 382:1177-1179. DOI: 10.1056/NEJMc2001737

ANEXO 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

No. HJM 001/20-1

Título de la Línea de Investigación:

Asociación del perfil de expresión de citocinas inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 en pacientes con el desarrollo de la enfermedad.

Teléfono de emergencia: 55 5401 3369

Dirección: Av. Instituto Politécnico Nacional No. 5160, Col. Magdalena de las Salinas, Acl. Gustavo A. Madero C.P. 07760

Sede donde se realizará el estudio: HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

Nombre del paciente: _____

Marque con una X la opción que corresponda:

Sujeto NO competente.

A su paciente se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Sujeto competente.

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Debido a la alta variabilidad de cada individuo al progreso de la enfermedad por COVID-19 (moderados y graves), la evaluación de los riesgos como lo son la respuesta inflamatoria sistémica y carga viral, permitirá establecer estrategias de manejo del paciente con COVID-19. Se ha reportado que la presentación grave de la enfermedad está asociada en algunos casos por el desarrollo de una respuesta inflamatoria sistémica caracterizada por la liberación incontrolada de citocinas inflamatorias originando una tormenta de citocinas relacionada a un mayor deterioro de paciente y mortalidad. La comprensión de los cambios en la respuesta inmune de los pacientes con SARS-CoV-2 mediante la caracterización de la expresión anormal de citocinas y la carga viral en las diferentes fases de la enfermedad (moderada y grave), permitirá tener un conocimiento más amplio de la misma, y por lo tanto proponer posibles estrategias de intervención dirigida al paciente con COVID-19. Adicionalmente, los resultados que deriven de este estudio podrían servir para futuras investigaciones que tengan por objetivo comprender la fisiopatología molecular del COVID-19, a fin de garantizar un tratamiento adecuado en los pacientes.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO.

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo evaluar la asociación del perfil de expresión de citocinas inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 con la presentación de la enfermedad moderada y grave de COVID-19.

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO.

En este estudio no existirá un beneficio directo para usted como paciente, sin embargo, permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse de los resultados obtenidos, pues el personal médico podría establecer estrategias en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Asimismo, los resultados que deriven del mismo, podrían servir para futuras investigaciones que tengan por objetivo comprender la fisiopatología del COVID-19.

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO.

En caso de aceptar participar en el estudio, se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus antecedentes médicos, así como también se le realizará una punción venosa en el brazo para la obtención de sangre periférica. Esta será procesada y analizada por los investigadores en el Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular del Hospital Juárez de México

Se le advierte sobre la posibilidad de descubrimientos inesperados en el proceso de análisis de la muestra, no relacionados con la patología de diagnóstico, y respecto a los mismos manifiesta:

Quiero conocerlos No quiero conocerlos Delego en el médico esa decisión

Al término de la investigación, se contará con su muestra de sangre periférica; desea que esa muestra:

Se destruya Se almacene para futuras investigaciones

En caso de desear que su muestra se almacene para futuras investigaciones, usted podrá ser contactado con posterioridad. Usted tiene derecho a revocar este consentimiento en cualquier momento, y a decidir también la destrucción de su muestra.

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO.

De acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, esta investigación es considerada como:

Sin Riesgo Riesgo Mínimo Riesgo Mayor al mínimo

Este proyecto se clasifica como *riesgo mínimo* debido a que se realizará la toma de muestra de sangre periférica a través de una única punción venosa al inicio del proyecto.

Únicamente se le tomarán 3 ml de sangre (1 cucharada pequeña) misma que tiene riesgo de producir un pequeño moretón y debe ser tratado colocando un hielo envuelto en un pedazo de tela por 3 minutos cederá la molestia. En caso de persistir la molestia, usted puede acudir con su médico tratante dentro del hospital y sin costo para usted.

Este estudio consta de varias etapas, pero su participación como donante de la muestra de sangre periférica solo será en la primera. Es posible que debido a la punción, usted llegue a manifestar un

pequeño moretón en la zona donde se introdujo la aguja, lo cual es normal y no conlleva ningún peligro para su salud

6. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES.

a) Normatividad.

El tratamiento de sus datos personales de identificación y datos personales sensibles, se realiza con fundamento en lo establecido en el artículo 1, 2 fracción V y VI, 3, 8, 16, 17, 18, fracción VII del 22, 26, 27 y demás relativos de la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados; 1 del Decreto por el que se crea el Hospital Juárez de México, como un Organismo Descentralizado de la Administración Pública Federal, publicado en el Diario Oficial de la Federación, el 26 de enero de 2006; 1, 2 fracción I y 3 fracción I, II, III del Estatuto Orgánico del Hospital Juárez de México, publicado en el Diario Oficial de la Federación 17 de octubre de 2016.

b) Descripción de los Datos Personales que se solicitarán.

* Datos Personales de Identificación: Nombre del paciente y número de expediente

* Datos Personales sensibles: No se requieren datos de este tipo

c) Tratamiento.

El tratamiento y resguardo de sus datos personales será llevado a cabo por los Investigadores Participantes en esta investigación (enlistados al inicio del presente documento). Los datos personales serán tratados estadísticamente sin que se vulnere su identidad mediante el proceso de disociación. (Si tiene duda, pregunte al Investigador Principal en qué consiste el proceso de disociación)

d) Transferencias.

Marque con una X la opción que corresponda:

() Sus datos personales y/o resultados que arroje el estudio, NO serán transferidos a ninguna persona física o moral.

() Sus datos personales y/o resultados del estudio podrán ser transferidos

e) Aviso de Privacidad simplificado:

El Investigador principal del Protocolo/Tesis de Investigación es el responsable del tratamiento de los datos personales y datos personales sensibles que usted proporcione con motivo de la participación en un Protocolo/Tesis de Investigación, mismos que serán tratados estadísticamente en materia de salud sin que se vulnere su identidad mediante el proceso de disociación, para proteger la identificación de los mismos, de conformidad con los artículos 1, 2, 3, 8, 16, 17, 18, fracción VII del 22, 26, 27 y demás relativos de la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados, mismo que podrá consultar en el Portal Institucional:

<http://www.hospitaljuarez.salud.gob.mx>

7. ACLARACIONES.

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aún cuando el investigador responsable no se lo solicite, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.

No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.

No recibirá pago por su participación.

En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, a los investigadores participantes.

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores participantes.

Usted también tiene acceso a los Comités de Investigación y Ética en Investigación del Hospital Juárez de México a través del **Dr. José Moreno Rodríguez**, Director de Investigación y Enseñanza o la **Dra. en C. Nayeli Goreti Nieto Velázquez**, Presidente del Comité de Ética en Investigación. En el edificio de Investigación del Hospital Juárez de México.

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación o la de su paciente, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado.

Marque con una X la opción que corresponda:

Sujeto NO competente.

Yo, _____, responsable directo del paciente, de _____ años de edad, manifiesto que otorgo de manera voluntaria mi permiso para que se le incluya como sujeto de estudio en la línea de investigación médica.

Sujeto competente.

Yo, _____, he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma

Fecha

****Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):**

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre y Firma del Investigador

Fecha

8. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.

Título de la Línea de Investigación:

Asociación del perfil de expresión de citocinas inflamatorias y carga viral de SARS-CoV-2 en pacientes con el desarrollo de la enfermedad.

Sede donde se realizará el estudio: HOSPITAL JUÁREZ DE MÉXICO

Nombre _____ del _____ participante:

Marque con una X la opción que corresponda:

Sujeto NO competente.

Yo, _____, responsable directo del paciente, de _____ años de edad, he decidido excluirlo(a) del estudio de investigación médica por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea)

Sujeto competente.

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este estudio de investigación por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea)

Si así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado, con motivo de su participación o la de su paciente en el presente estudio.

Firma

Fecha

c.c.p El paciente o su representante. (Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en su poder)