



Universidad de Valladolid



**PROGRAMA DE DOCTORADO INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

TESIS DOCTORAL:

**Biomarcadores moleculares en la
predicción de gravedad en pacientes
hospitalizados por COVID-19**

Presentada por D. Óscar Gorgojo Galindo para
optar al grado de Doctor/a por la Universidad
de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Eduardo Tamayo Gómez

Dr. Hugo Gonzalo Benito

Dr. Adrián García Concejo

Certificación

Prof. Dr. Eduardo Tamayo Gómez, Catedrático de Anestesiología del Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia de la Universidad de Valladolid, Dr. Hugo Gonzalo Benito, Profesor Asociado del Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia de la Universidad de Valladolid y Dr. Adrián García Concejo, investigador postdoctoral del Centro de Investigación Biomédica en Red en el área de Enfermedades Infecciosas del Instituto de Salud Carlos III.

Certifican:

*que la Tesis Doctoral “**Biomarcadores moleculares en la predicción de gravedad en pacientes hospitalizados por COVID-19**”, presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valladolid en la **modalidad de Tesis Doctoral por compendio de publicaciones**, ha sido realizada por **Óscar Gorgojo Galindo** bajo nuestra dirección en el Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia de la Universidad de Valladolid y la Unidad de Investigación del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Valoramos que reúne, a razón de nuestro juicio, los requisitos precisos por lo que autorizamos su presentación para ser evaluada.*

Y para que así conste, a efectos legales, expiden el presente certificado en Valladolid, a 8 de abril de 2025.

Fdo. Hugo Gonzalo Benito Fdo. Eduardo Tamayo Gómez Fdo. Adrián García Concejo

A mi abuela, Vicenta

Agradecimientos

Es imposible empezar de otra forma que no sea agradeciendo a mis directores por permitirme comenzar esta intrépida aventura que es la investigación. Gracias Eduardo por enseñarme lo que significa ser un investigador con todas las letras, empezando por la curiosidad, la honestidad, el rigor, la eficiencia, el liderazgo, la dedicación y terminando por la calidad humana que cualquier persona con éxito académico debe tener de base. Tampoco se puede desdeñar la accesibilidad que siempre has tenido a pesar del poco tiempo que dispones, pero siempre encontrabas un hueco para hablar conmigo. Gracias Hugo por ponerte en contacto conmigo para hacerme la entrevista y comunicarme un 16 de septiembre del 2020 que os había parecido un buen candidato para unirme a vuestro maravilloso equipo. Eduardo y tú me disteis una gran oportunidad por la que siempre estaré agradecido. Además, encontré un director que siempre tuvo mucha paciencia para enseñarme lo que estos años he necesitado y proporcionándome los recursos para llevarlo a cabo, mientras, al mismo tiempo, me daba consejo cuando no encontraba respuesta. Por último, pero no menos importante, quiero dar las gracias a Adrián que, aunque te incorporaste en mi supervisión académica en los años posteriores, has resultado imprescindible para llegar a este punto; siendo un gran maestro para llevar a cabo multitud de experimentos, que, aunque no figuren totalmente en esta memoria, estoy seguro de que figurarán en algún lado ya sea en publicaciones posteriores o en los sitios que me deparen.

No puedo olvidar agradecer a la Junta de Castilla y León que han retribuido mi trabajo durante estos últimos 4 años a través de la convocatoria de contratos predoctorales. Esta ampliamente demostrado que la riqueza de un país se relaciona estrechamente con la inversión en ciencia. En una situación de incertidumbre profesional que ciertas carreras como la biología experimenta, es de agradecer que las instituciones destinen dinero público para dignificar una labor que requiere de tanto esfuerzo y tiempo como es la investigación.

Seguidamente quiero hacerles llegar mi gratitud a los compañeros presentes y pasados de mi querida unidad de investigación del HCUV. Gracias a mis compañeras María, las Rosas del norte y sur y Paula por haber sido un importante apoyo en los últimos años mientras trabajábamos o salíamos a tomar alguna que otra cerveza. A Jessica, mi “madre” en el laboratorio, te agradezco especialmente el enorme apoyo y enseñanzas que me has dado desde que te conozco. Muchos días en los que los fracasos me abrumaban

siempre me dabas aliento para continuar, gracias. Me gustaría expresar también mi gratitud a los miembros del Centro Nacional de Gripe que incluye desde su responsable, Iván Sanz, hasta su maravilloso equipo entre los que se incluye a Javy, Carla, Irene, Encarni, Alex y Diana, que han hecho más fácil el tránsito por esta aventura.

Me gustaría dedicar unas palabras a mis amigos Juan Carlos, Antonio y Aarón. Conozco a Juan Carlos y Antonio desde el colegio y solo espero que, a lo largo de nuestras vidas, sigamos pasando buenos momentos. Os agradezco de corazón por estar ahí, por ayudarme a desconectar y desahogarme cuando más lo he necesitado. En cuanto a Aaronsito, ¡qué puedo decir! Eres una de las personas con mayor calidad humana que he conocido, como solo un gran enfermero puede ser ¡Muchas gracias!

Respecto a mi familia, mis padres y mi hermano han sido un pilar fundamental que me han ayudado en incontables momentos. No podría estar escribiendo estas líneas sin ellos. Mi madre consigue algo más difícil que cualquier tesis y es dar consuelo a pesar de no comprender del todo de qué va el mundo de la investigación y lo que te hace sentir esa enorme competencia silenciosa. Mi padre me enseñó la paciencia y el cariño por hacer bien las cosas; fundamental en cualquier trabajo. En cuanto a mi hermano, yo como el hermano pequeño resultaba lógico que me fijase en él, admirando y siendo para mí un referente a imitar ¡Gracias y os quiero!

Por último, me gustaría expresar mi gratitud al resto de mi familia por el apoyo recibido durante este tiempo, concretamente me gustaría dedicar esta última frase a mi abuela Vicenta que la perdí durante estos años y supuso uno de los grandes apoyos que tuve.

ÍNDICE

- ABREVIATURAS.....	4
- RESUMEN.....	8
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	13
1. Surgimiento del SARS-CoV-2 y estallido de la pandemia.....	15
2. Características biológicas del SARS-CoV-2.....	16
2.1. Taxonomía y genoma.....	16
2.2. Ciclo replicativo.....	18
2.3. Diversidad genética y su implicación sanitaria.....	20
2.4. Transmisión.....	21
3. Inmunología de la COVID-19.....	22
3.1. Reconocimiento y respuesta innata.....	22
3.2. Mecanismos de evasión del SARS-CoV-2.....	25
3.3. Respuesta mediada por linfocitos T.....	26
3.4. Tormenta de citoquinas.....	28
4. Manifestaciones clínicas y factores asociados a COVID-19 severo.....	29
5. Diagnóstico y pronóstico de la COVID-19.....	35
6. Tratamiento frente a SARS-CoV-2.....	40
6.1. Agentes antivirales.....	41
6.2. Terapias dirigidas al huésped.....	42
CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN.....	47
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	52
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
1. Diseño y población de estudio.....	56
2. Datos clínicos y colección de muestras.....	56
3. Análisis del perfil de citoquinas.....	57
4. Análisis del miRNoma por secuenciación de alto rendimiento, análisis bioinformático de los datos y predicción de las dianas.....	57
5. Análisis estadístico.....	58

CAPÍTULO V: RESULTADOS.....	62
1. Modelo predictivo de severidad y mortalidad en pacientes COVID-19 basado en datos clínicos, analíticos y perfil de citoquinas	64
1.1. Variable de estudio y características de los pacientes.....	64
1.2. Análisis del perfil de citoquinas.....	66
1.3. Factores de riesgo asociados a desenlace clínico desfavorable en pacientes hospitalizados con COVID-19.....	66
2. Evolución temporal de los perfiles de citoquinas asociados con la mortalidad en pacientes hospitalizados por COVID-19.....	69
2.1. Variable de estudio y características de los pacientes.....	69
2.2. Análisis del perfil de citoquinas.....	69
2.3. Análisis de componentes principales.....	71
2.4. Puntuación de los componentes principales en sobrevivientes vs. no sobrevivientes.....	72
2.5. Análisis multivariante de los componentes principales asociados a la mortalidad a 28 días.....	74
3. Perfil de miRNAs en vesículas extracelulares de pacientes COVID-19 como predictores de la mortalidad.....	75
3.1. Variable de estudio y características de los pacientes.....	75
3.2. Perfiles de miRNAs derivados de vesículas extracelulares plasmáticas y libres en plasma entre pacientes con COVID-19 grave y controles.....	75
3.3. Mortalidad a los 90 días y análisis de supervivencia.....	84
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.....	90
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES.....	101
CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	105
CAPÍTULO IX: ANEXOS.....	141

ABREVIATURAS

ACE2: del inglés *angiotensin converting enzyme 2* (enzima convertidora de angiotensina 2)

BDNF: del inglés *brain-derived neurotrophic factor* (Factor neurotrófico derivado del cerebro)

CCL: del inglés *C-C motif chemokine ligand* (Ligando de quimiocinas con motivo C-C)

CDC: del inglés *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades)

CI: del inglés *Confidence Interval* (Intervalo de confianza)

CLR: del inglés *C-type lectin receptors* (Receptores de lectinas de tipo C)

CoV: coronavirus

COVID-19: del inglés coronavirus disease 19 (Enfermedad por coronavirus 2019)

CXCL: del inglés *C-X-C motif chemokine ligand* (Ligando de quimiocinas con motivo C-X-C)

DAMP: del inglés *damage-associated molecular pattern* (patrones moleculares asociado a daño)

DC-SIGN: del inglés *dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas-3- integrina no captadora)

DNA: del inglés *deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EVs: del inglés *extracellular vesicles* (vesículas extracelulares)

FC: del inglés *Fold Change*

FDA: del inglés *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos)

GM-CSF: del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos)

HGF: del inglés *hepatocyte growth factor* (Factor de crecimiento de hepatocitos)

HIV: del inglés *human immunodeficiency virus* (Virus de la inmunodeficiencia humana)

IFN: Interferón

Ig: inmunoglobulinas

IKK: del inglés *IkB kinase complex* (Complejo IkB quinasa)

IL: Interleucina

IRF: del inglés *interferon regulatory factors* (Factores reguladores del interferón)

JAK: del inglés *Janus kinase* (Janus quinasa)

LDH: del inglés *lactate dehydrogenase* (Lactato deshidrogenasa)

L-SECTin: del inglés *liver sinusoidal endothelial cell lectin* (Lectina de células endoteliales sinusoidales hepáticas)

L-SIGN: del inglés *liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin* (Molécula de adhesión intercelular específica de los ganglios linfáticos y hepáticos - integrina de agarre 3)

MCP: del inglés *monocyte chemotactic proteins* (Proteínas quimiotácticas de monocitos)

MDA5: del inglés *melanoma differentiation-associated protein 5* (Proteína 5 asociada a la diferenciación del melanoma)

MERS: del inglés *middle east mespiratory síndrome* (Síndrome mespiratorio de oriente medio)

miRNA: del inglés *microRNA* (microARN)

mRNA: del inglés *messenger RNA* (ARN mensajero)

NF-κB: del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)

NK: del inglés *natural killer cell* (Célula asesina natural)

OR: del inglés *Odds Ratio* (Razón de posibilidades)

ORF: del inglés *Open Reading Frame* (Marco de lectura abierto)

PAMP: del inglés *pathogen-associated molecular pattern* (Patrones moleculares asociado a patógeno)

PCA: del inglés *principal component análisis* (Análisis de componentes principales)

PCT: procalcitonina

RdRp: del inglés *RNA-dependent RNA polymerase* (ARN polimerasa dependiente de ARN)

RIG: del inglés *retinoic acid-inducible gene* (Gen inducible por ácido retinoico)

RLR: del inglés *RIG-I-like receptors* (Receptores de tipo RIG-I)

- RNA:** : del inglés *ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
- ROS:** del inglés *reactive oxygen species* (Especies reactivas de oxígeno)
- RT-qPCR:** del inglés *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción)
- SARS:** del inglés *severe acute respiratory syndrome* (Síndrome respiratorio agudo grave)
- SCF:** del inglés *stem cell factor* (Factor de células madre)
- SDE:** en inglés *significantly differentially expressed* (Expresión diferencial significativa)
- STAT:** del inglés *signal transducer and activator of transcription* (Transductor de señal y activador de la transcripción)
- TGF:** del inglés *transforming growth factor* (Factor de Crecimiento Transformante)
- Th:** del inglés *T helper cell* (Linfocitos T cooperadores)
- Thf:** del inglés *T Follicular helper cells* (Linfocitos T cooperadores de folículos)
- TLR:** del inglés *Toll-like receptors* (Receptores de tipo Toll)
- TMPRSS2:** del inglés *transmembrane serine protease 2* (Serin proteasa de transmembrana de tipo 2)
- TNF:** del inglés *tumor necrosis factor* (Factor de necrosis tumoral)
- TRAIL:** del inglés *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral)
- Treg:** del inglés *Regulatory T cells* (Linfocitos T reguladores)
- UCI:** Unidades de Cuidados Intensivos
- UTR:** del inglés *untranslated region* (Regiones no traducidas)
- VEGFA:** del inglés *vascular endothelial growth factor A* (Factor de crecimiento endotelial vascular A)

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los coronavirus han constituido durante los últimos 20 años un importante grupo de patógenos respiratorio emergentes, que han sido responsables de importantes brotes infecciosos en regiones de oriente próximo y Asia. En diciembre de 2019, surgió en China el SARS-CoV-2, cuyas particulares características derivaron en la pandemia de la COVID-19, que supuso un importante problema para los sistemas de salud en la mayoría de países. El riesgo de colapso en los servicios sanitarios precisaba de un conocimiento profundo de este virus respiratorio, para determinar de manera rápida y precisa la evolución desfavorable en pacientes hospitalizados y abrir la posibilidad de terapias eficaces.

Los casos severos de COVID-19 se caracterizan por una hiperproducción de citoquinas, que se deriva de una ineficaz respuesta mediada por interferones, acompañada con linfocitopenia y descoordinación entre la respuesta innata y adaptativa. La evasión de la respuesta innata a través de las proteínas no estructurales del virus y miRNA, generados tanto por el propio virus como el huésped durante la infección, conlleva a una grave afección respiratoria que reduce las posibilidades de supervivencia en los casos más severos. No obstante, la amplia heterogeneidad entre los pacientes COVID-19 debido a la influencia de factores de riesgo y comorbilidades, hace difícil determinar con certeza la posibilidad de un desenlace fatal, a pesar de disponer de mediciones comunes en la práctica clínica, pero no específicas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Bajo este contexto, se plantea la hipótesis de describir biomarcadores moleculares relacionados con la respuesta inmune que sean importantes en la prognosis de pacientes COVID-19.

De esta manera, el objetivo general propuesto consiste en caracterizar el perfil de citoquinas y miRNA, como posibles determinantes en la alteración de la respuesta inmune de pacientes COVID-19 hospitalizados y que conllevan a una evolución desfavorable en

cuanto a la severidad o mortalidad. Por consiguiente, se definen ciertos objetivos específicos:

El **primer objetivo específico** consistió en describir un modelo simple, preciso y robusto basado en el perfil de citoquinas y datos clínicos, para predecir severidad y mortalidad en base al requerimiento de ventilación mecánica en pacientes con riesgo de exitus.

Teniendo en cuenta la importancia del perfil de citoquinas en el pronóstico de pacientes COVID-19 hospitalizados y su posible variación a lo largo del tiempo, se estableció como **segundo objetivo específico** determinar de qué forma varían las citoquinas implicadas de manera significativa en la mortalidad y establecer grupos de citoquinas y tiempos más adecuados en determinar un fatal desenlace.

El **tercer objetivo específico** tuvo en cuenta los miRNA como otro grupo de biomarcadores importantes durante la fisiopatología de la COVID-19. A partir de las vesículas extracelulares en plasma de pacientes hospitalizados, se determinaron los miRNA asociados a la mortalidad y, así, inferir en los aspectos relevantes de la respuesta inmune que afectan a la mortalidad.

METODOLOGÍA

Estudio observacional de pacientes con resultado positivo por RT-qPCR de COVID-19 ingresados en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid (España) entre el 24 de marzo y el 11 de abril de 2020. No fueron incluidos en el estudio pacientes con otras infecciones activas o enfermedades crónicas terminales. Se obtuvieron muestras de suero sanguíneo de cada paciente y los datos demográficos, clínicos y analíticos se registraron para su uso en el análisis estadístico. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética Clínica del Hospital (cod: PI 20-1717).

Las 45 citoquinas del primer, tercer y sexto día de ingreso fueron cuantificadas por duplicados mediante la tecnología Luminex mediante el panel comercial kit 45-plex Human XL Cytokine Luminex Performance Panel (R&D).

El RNA de las vesículas extracelulares fueron extraídas a partir de exoRNeasy Midi Kit (Qiagen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Una vez valorado la

cantidad y calidad se secuencio los miRNA mediante la creación previa de librerías con NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit y el secuenciador NovaSeq 6000 (Illumina) por la empresa ADM-BIOPOLIS GENOMICS en el parque científico de la universidad de Valencia (España).

Los datos fueron analizados tanto el paquete estadístico Software IBM SPSS Statistics (SPSS) versión 28 como el paquete estadístico R versión 4.2.3.

RESULTADOS

- Entre las 45 citoquinas cuantificadas en 108 pacientes COVID-19, el HGF fue la única citoquina que formó parte del modelo multivariable asociado al riesgo de intubación o fallecimiento en el día de ingreso (OR = 7.38, 95%CI—(1.28–42.4), $p = 0.025$). El grupo sanguíneo O constituyó el único dato clínico como factor protector, mientras que la glucemia, dímero D, procalcitonina y ferritina contribuían al modelo logístico multivariable como factores de riesgo. Se validó el modelo internamente, por un lado, a través del método AUROC mostrando un área bajo la curva de 0.94 con una sensibilidad del 91,7% y una especificidad del 95%. Por otro lado, un segundo método de validación por bootstrapping permitió confirmar los resultados simulando la aplicación del modelo con una muestra mayor.
- El análisis de componentes principales englobó tres grupos de citoquinas asociadas a la mortalidad de pacientes hospitalizados por COVID-19. La combinación constituida por HGF, MCP-1, IL-18, eotaxina y SCF fue significativamente alta en los fallecidos durante los tres tiempos del estudio, mostrando una tendencia creciente. Sin embargo, los niveles de IL-1 α y VEGFA, aunque mayor en el grupo de los fallecidos, no mostraron variaciones significativas en el resto de los tiempos de recolección de muestra. Por último, la combinación de BDNF, IL-12 e IL-15 estuvieron reducidas en los fallecidos constituyendo un factor protector en los supervivientes. Los niveles de IL-1 α y VEGFA en el día de ingreso junto al resto de componentes medidos el sexto día permitían predecir el riesgo de fallecimiento con una precisión de 0,89 (CI: 0,81-0,96%; $p < 0,001$).

- Los pacientes con COVID-19 severo mostraron una expresión diferencial de 50 miRNAs derivados de vesículas extracelulares asociados a vías de señalización implicadas en la respuesta inflamatoria y adhesión celular. Concretamente, 15 miRNAs estuvieron asociados a los casos severos con respecto al grupo control. Finalmente, los miRNAs miR-1469 y miR-6124 fueron importantes predictores de la mortalidad con un AUC de 0,94.

CONCLUSIONES

La tesis que aquí se expone concluye que: (i) el HFG constituye un biomarcador importante a la hora de predecir morbilidad y severidad teniendo en cuenta la glucemia, dímero D, procalcitonina, ferritina y grupo sanguíneo (ii) los pacientes COVID-19 que remitieron muestran niveles elevados de BDNF, IL-12 e IL-15 relacionado con respuesta eficaz por parte de linfocitos T y células NK, (iii) las citoquinas HGF, MCP-1, IL-18, eotaxina y SCF presenta una tendencia creciente en los pacientes de COVID-19 fallecidos durante su ingreso, mientras que IL-1 α y VEGFA se mantiene constante en los primeros seis días de ingreso, (iv) los miRNAs miR-1469 y miR-6124 están diferencialmente expresados en los casos severos y son capaces de predecir con alta precisión la mortalidad en los pacientes hospitalizados por COVID-19.

CAPÍTULO I:
INTRODUCCIÓN

1. Surgimiento del SARS-CoV-2 y estallido de la pandemia

A mediados de diciembre de 2019, en la ciudad china de Wuhan, surgió un grupo de pacientes con cuadro de neumonía atípica que no respondían adecuadamente a los tratamientos convencionales [1]. La delegación china de la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó que los nuevos casos de neumonía de etiología desconocida tenían origen en un mercado local de la ciudad [2]. A principios del 2020, el centro nacional de inmunización y enfermedades respiratorias del Centers for Disease Control and Prevention (CDC) secuenció el genoma del agente causal de la enfermedad, tratándose de un nuevo coronavirus recibiendo el nombre de SARS-CoV-2 [3]. En cuestión de dos semanas, se reportaron nuevos casos en cuatro países asiáticos y su propagación siguió exponencialmente hasta declararse la pandemia el 11 de marzo de 2020; con más de 118.000 casos en 114 países y 4.291 muertes reportadas en ese momento [4]. Durante dicho periodo se dio a conocer públicamente la secuencia del nuevo coronavirus cuya enfermedad asociada fue bautizada por la OMS como “enfermedad por coronavirus de 2019” (COVID-19) [3,5,6]. En ese momento se determina que la transmisión es principalmente a través de microgotas de Flügge que se emiten al hablar, estornudar, toser o espirar al entrar en contacto con las mucosas del receptor o introducidas desde las manos [7]. Aunque partir de la secuencia inicial del virus se desarrollaron los primeros kits de detección basados en RT-qPCR, la problemática continuó debido al prolongado periodo de incubación y el importante porcentaje de asintomáticos transmisores del virus [8,9]. Desde el momento de declararse la pandemia se comienza a implantar medidas preventivas de cuarentena, distanciamiento social y uso de mascarillas [10,11].

En los primeros meses desde que se declaró la pandemia, los países con más casos confirmados y de fallecidos fueron China, Italia, España y Estados Unidos. Concretamente a principios de abril tan solo en la ciudad de Nueva York se informó de 159.937 casos respecto a los 153.000 casos de España, 143.000 casos en Italia o 82.000 casos en China [12]. La principal problemática suponía la saturación de los sistemas de salud por la cual las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) tenían elevado riesgo de colapso, lo que impedía a su vez atender a otros pacientes en estado crítico. Dicha situación se agravaba aún más por la escasez de equipo de protección individual para el personal sanitario [13]. Entre abril y mayo de 2020 se lanzó la iniciativa para producir una vacuna que incluiría las vacunas basadas en RNAm posteriormente empleadas y la Food and Drug Administration (FDA) emite autorización para el uso de emergencia del

medicamento Remdesivir [14]. Otros tratamientos como la hidroxiclороquina fueron descartados al no tener ningún efecto en los enfermos de COVID-19 [15]. A partir de julio de 2020, se concluyó que la vacuna candidata de Pfizer BioNTech COVID-19 era segura y eficaz y se comenzó con los preparativos para su distribución a partir de diciembre de 2020. En ese momento también se incluyeron la vacuna Moderna COVID-19 y la desarrollada por la Universidad de Oxford llamada AstraZeneca [16–18]. Hasta final de año se destaca la aparición de pruebas rápidas de antígeno para la detección de la infección por COVID-19, se confirman casos de reinfección abriendo la posibilidad de revacunación en el futuro y se duda de la eficacia del Remdesivir para tratar a pacientes hospitalizados con COVID-19. Hoy en día se sigue dudando de su beneficios y eficacia [19–21]. La pandemia continuaría aproximadamente dos años y medio hasta declararse su final el 5 de mayo de 2023 tras 765 millones de casos confirmados y 6,9 millones de fallecidos reportados [22]. Sin embargo, tal como se sospechaba, el virus permanece y de manera similar a la gripe precisa de vacunaciones anuales, especialmente en aquellos grupos de riesgo que pueden desarrollar un peor pronóstico [23,24].

2. Características biológicas del SARS-CoV-2

2.1 Taxonomía y genoma del SARS-CoV-2

Los coronavirus son un amplio grupo de virus pertenecientes al orden *Nidovirales* que comprende virus con un genoma de RNA de polaridad positiva no segmentados de aproximadamente 30kb. El orden *Nidovirales* se define en base a cuatro características comunes al resto de categorías taxonómicas. En primer lugar, presentan una organización genómica muy conservada, con una replicasa-transcriptasa que precede a los genes estructurales y accesorios. En segundo lugar son capaces de expresar multitud de genes no estructurales por desplazamiento del marco ribosómico. En tercer lugar, la replicasa-transcriptasa posee varias actividades enzimáticas únicas que varía entre especies. Y por último, el orden *Nidovirales* llevan a cabo la expresión de sus genes estructurales y accesorios en dirección descendente o downstream a través de la síntesis de RNAm 3' subgenómico [25]. Dentro del mencionado orden, distinguimos la familia *Coronaviridae* que de acuerdo con criterios filogenéticos se dividen en 4 géneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* y *Deltacoronavirus* [26]. Los betacoronavirus infectan en su mayoría a los humanos y tienen un origen zoonótico. Han surgido como un

importante grupo de patógenos respiratorios que en los último 20 años han provocado importantes epidemias como las causadas por SARS-CoV, MERS-CoV y por último SARS-CoV-2; siendo especialmente relevante esta última por su alta patogenicidad y transmisibilidad [27].

El origen del SARS-CoV-2 no está completamente esclarecido. Existen dos posibilidades que explican su origen. La primera hipótesis sugiere que el origen viene de una especie de coronavirus de murciélago denominado RaTG13, ya que comparten el 96,2% de similitud entre sus genomas y debido al tráfico de animales salvajes podría haber favorecido el salto entre especies [28] . La segunda hipótesis considera el origen a partir del SARS-CoV debido a que comparten un 79% de similitud entre sus secuencia y a causa de mutaciones aleatorias, junto con una presión selectiva e inmunológica, dio lugar al SARS-CoV-2. En este sentido se considera que el pangolín actuó como reservorio previo al ser humano [6,29]. Además, aunque ambos coronavirus tienen como receptor a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), en el caso del SARS-CoV-2 este posee una mayor afinidad por la ACE2 que se ha correlacionado con una mayor transmisibilidad y severidad de la enfermedad [30]. Adicionalmente, la capacidad del virión para entrar en la célula huésped se encuentra potenciada en el SARS-CoV-2 por medio de la serin proteasa de transmembrana de tipo 2 (TMPRSS2), que intensifica la rapidez con la que el virus se replica [31].

El genoma del SARS-CoV-2 (**Fig. 1**) contiene 14 marcos de lectura abiertos (ORFs) en los que distinguimos proteínas estructurales (que incluyen las proteínas accesorias) y no estructurales, flanqueadas respectivamente por una cola de poli-A 3' y una caperuza 5', cada uno precedido con sus correspondientes secuencias untranslated regions (UTRs). Las proteínas estructurales codificadas por el extremo 3' incluyen la glicoproteína de la espícula (S), constituidas por dos dominios, proteínas de la envuelta (E), proteínas de membrana (M) y proteínas de la nucleocápside (N). Por otro lado, el extremo 5' codifica a 16 genes, específicos de la especie, denominadas proteínas no estructurales [32]. Estas proteínas no estructurales, en el caso del SARS-CoV-2, incluyen supresores de la respuesta antiviral del huésped como antagonista de interferones (IFNs), proteasas, proteínas de unión a RNA, RNA polimerasa dependiente de RNA, helicasa, metiltransferasa, exonucleasa 5'-3', endorribonucleasa y proteínas implicadas en la exportación del RNA replicado. Esta parte del genoma se focaliza en la

transcripción/replicación del genoma en la que presenta sitios de escisión relacionado con el ciclo replicativo e implicado en la patogénesis y transmisibilidad del virus [33–35].

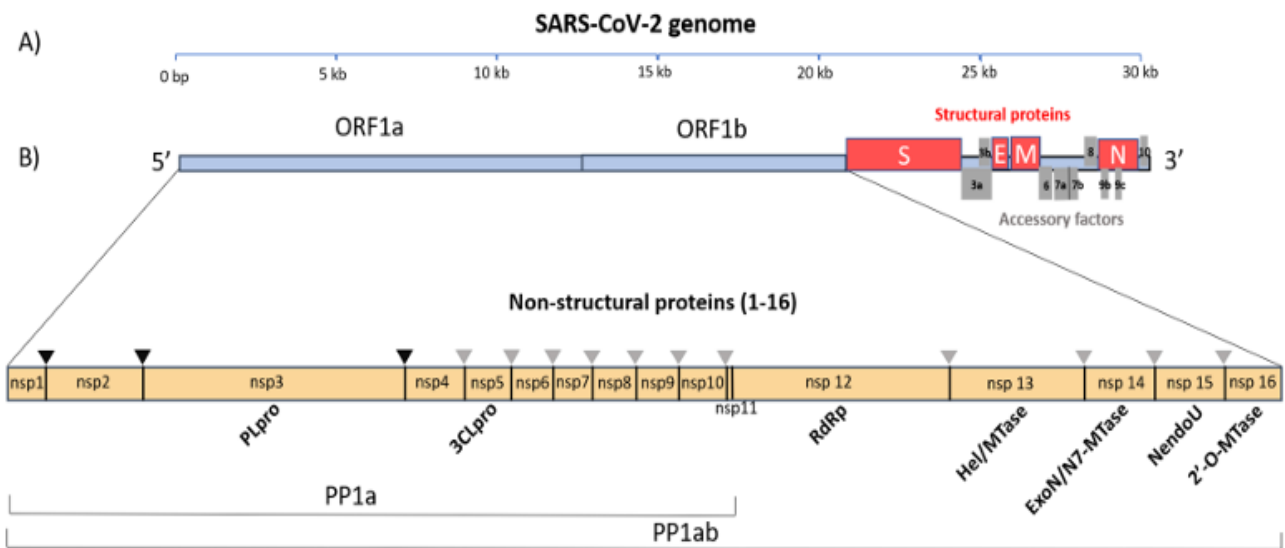


Figura 1: Representación esquemática del genoma del virus SARS-CoV-2. (A) Organización por ORFs individuales. (B) Polipéptido constituido por 16 proteínas no estructurales, los triángulos representan los sitios de escisión por los dos tipos de proteínas que expresa el virus. Imagen obtenida de la publicación Romano et al. [36].

2.2 Ciclo replicativo del SARS-CoV-2

La entrada de los viriones del SARS-CoV-2 se inicia mediante la interacción de la espícula con la enzima ACE2, expresada en el tracto respiratorio, cardiovascular y renal. La interacción entre estas proteínas induce la endocitosis, y en el endosoma resultante se produce la escisión de la espícula por parte de una serín proteasa denominada TMPRSS2 o también de manera secundaria por la endopeptidasas de cisteína cathepsina L [31,37]. La escisión del primer dominio ocasiona un cambio conformacional que expone un péptido a través del cual se fusionan la envuelta del virión con la membrana del endosoma, liberando el genoma del virus al citoplasma [35,38]. Inmediatamente, se produce la primera traducción y procesamiento postraduccional de los dos grandes ORFs, correspondientes a los genes no estructurales (**Fig. 1**), que conforman en su conjunto un complejo con actividad replicasa-transcriptasa. Una vez formado este complejo, se produce la replicación del RNA genómico viral a RNA de polaridad negativa [35]. Dicho proceso transcurre en un tipo de vesículas de doble membrana nuclear, derivado del

retículo endoplasmático, que protege contra la degradación del RNA viral donde se puede formar transitoriamente un RNA de doble cadena [34,39]. A partir de esta copia de RNA de polaridad negativa, se origina más complejo replicasa-transcriptasa, que producirá nuevos genomas víricos necesarios en el posterior ensamblaje, y por otro lado, RNAm 3'subgenómico de diferente longitud (denominada transcripción discontinua) que conforman las secuencias molde para traducir las proteínas estructurales y accesorias [40]. Las proteínas estructurales y accesorias se traducen principalmente en el retículo endoplasmático rugoso y durante el tráfico vesicular por compartimento intermedio del retículo endoplasmático-Golgi se ensambla con el RNA genómico viral replicado, dando lugar a la partícula viral que será liberada al medio extracelular por exocitosis [41].

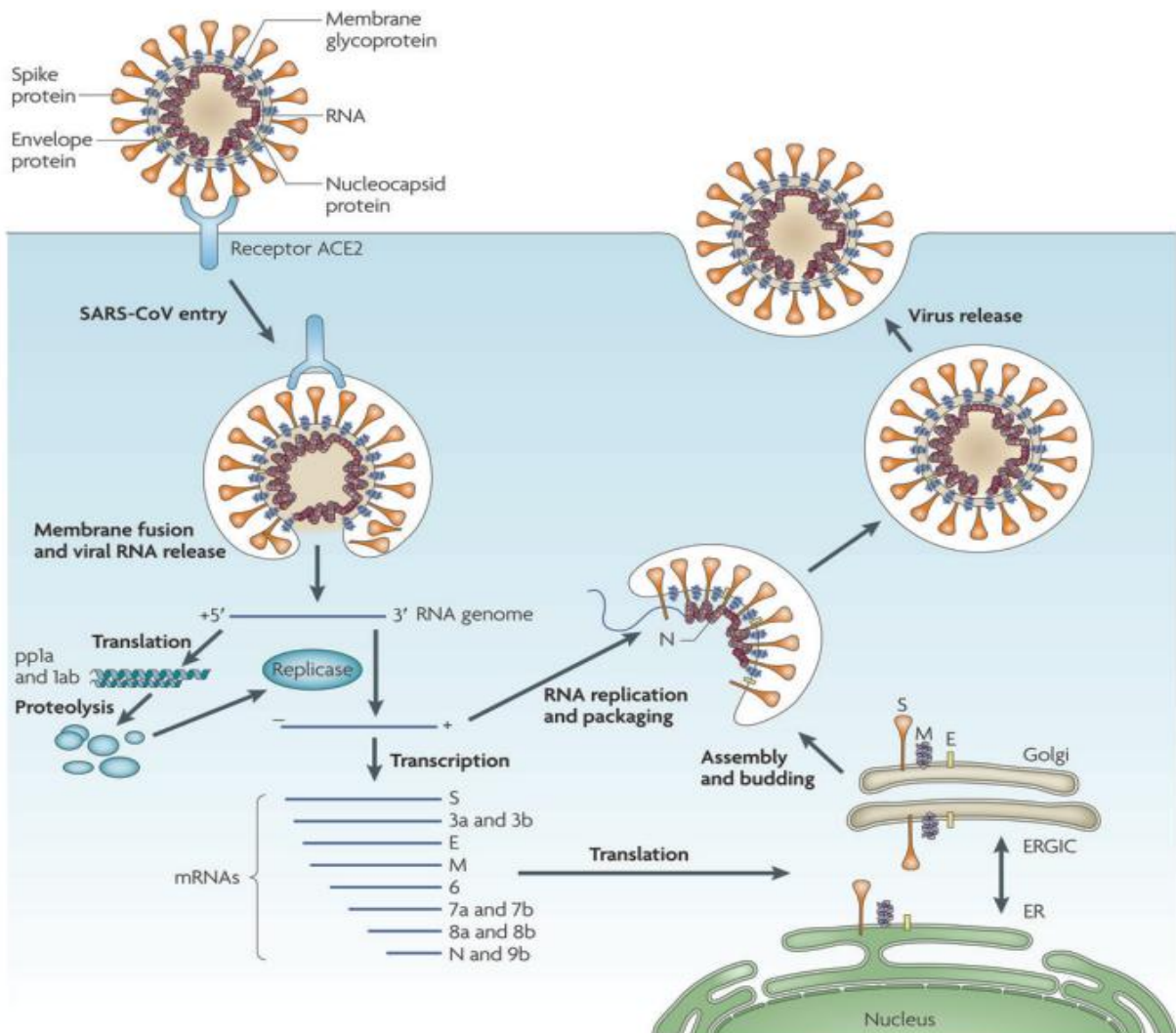


Figura 2: Ciclo de vida de SARS-CoV-2 en la célula huésped. Imagen obtenida de Du Let al. [42].

2.3. Diversidad genética del SARS-CoV-2 y su implicación sanitaria

Un aspecto relevante de los coronavirus, incluido el SARS-CoV-2, es la significativa tasa de recombinación, tanto inserciones como deleciones, y mutaciones puntuales que se produce durante la transcripción discontinua en su ciclo replicativo [43]. Aunque la mayoría de los cambios tiene escaso o nulo efecto en las propiedades del virus [44], la relativa rapidez con la que se produce dichos cambios en las secuencias de los genes estructurales y accesorias del SARS-CoV-2, origina una importante variabilidad genética que, por presión selectiva, conlleva al surgimiento de variantes con una mayor capacidad de transmisión y evasión de la respuesta inmune, incluso luego de la vacunación [45]. Se distinguen variantes bajo vigilancia (VUM), variantes de interés (VOI) y variantes preocupantes (VOC) en función del riesgo para la salud pública mundial; con el objetivo de establecer prioridad de seguimiento, investigación y respuesta epidemiológica [46]. Las VUM constituye una categoría de alerta para tener en cuenta para esclarecer si puede representar una amenaza a los sistemas de salud. En cuanto a los otros dos tipos de variantes, presentan mutaciones que suponen un cambio en el comportamiento epidemiológico del virus. En el caso de las VOI se han producido cambios que afectan a la unión al receptor y por lo tanto una menor capacidad neutralizante de los anticuerpos, lo que pronostica un aumento en la transmisibilidad o gravedad al verse comprometida la eficiencia de las vacunas y tratamientos. Sin embargo, las VOC presentan evidencias de una mayor transmisibilidad junto a un marcado efecto negativo respecto a la gravedad de la enfermedad y/o disminución en la eficacia de las vacunas [47]. Actualmente la variante ómicron representa la VOC principal y más divergente con numerosos subvariantes y linajes, caracterizadas por su mayor transmisibilidad y capacidad para evadir la inmunidad existente y, por lo tanto, ocasionar un mayor número de casos severos de COVID-19 [48]. Respecto a las VOI actuales, la primera en surgir fue la denominada BA.2.86 que presenta alrededor de 30 mutaciones en la secuencia de la proteína S, considerándose filogenéticamente diferente al linaje parental ómicron XBB [49]. De hecho, la segunda VOI que actualmente también encontramos en circulación, denominada JN.1 o BA.2.86.1.1, surge de BA.2.86 con tres mutaciones adicionales que favorece la evasión de la respuesta inmune incluso en los individuos vacunados [49].

2.4. Transmisión del SARS-CoV-2

La transmisión del SARS-CoV-2 se produce por varias vías que incluyen: (1) gotas de Flügge o microgotas las cuales se emiten al hablar, toser estornudar y respirar y que entran en contacto con la mucosas de la boca, nariz e incluso ojos [50], (2) aerosoles, partículas más pequeñas emitidas junto a las microgotas, pero con la diferencia que se mantienen más tiempo suspendidas en el aire y son inhaladas [51], (3) contacto directo o físico de una persona infectada a otra, (4) contacto indirecto o por fómites; es decir, contacto con objetos o superficies que ha sido tocado por una persona infectada, o donde han depositado gotículas/aerosoles expelidas por una persona infectada [52] y (5) otras vías atípicas como heces y orina, sangre, transplacentaria y zoonótica entre el humano y animales domésticos como perros o gatos [53,54]. No obstante, la principal forma de contagio son las microgotas y aerosoles por proximidad entre personas [55].

Al inicio de la pandemia el número reproductivo básico (R_0), definido como el número medio de casos secundarios que se producen a partir de un único caso de una población distribuida homogéneamente y totalmente susceptible a la infección, estimaba un valor general para la COVID-19 de 2-3, siendo similar o ligeramente superior al SARS-CoV [56,57]. Sin embargo, los modelos empleados no estimaron correctamente dicho valor, ya que la proporción de asintomáticos al principio de la pandemia era superior a la epidemia producida por el anterior SARS-CoV, constituyendo cerca del 24% de infectados [58]. La proporción de asintomáticos, la rapidez con la que infectaba el SARS-CoV-2 a las células huésped y el tiempo de incubación prolongado de hasta 14 días, fueron los factores clave para entender el estallido de la pandemia. Hoy en día, el tiempo de incubación de la variante ómicron se ha reducido entre 2-4 días y junto a los programas de vacunación han ayudado a evitar nuevos brotes importantes de SARS-CoV-2 [59]. Sin embargo, la cobertura de la vacuna se estima en 6 meses a partir del cual el virus puede volver a iniciar los mecanismos dañinos que pueden evolucionar a formas más severas de la enfermedad, especialmente en la población de riesgo [24].

3. Inmunología de la COVID-19

3.1. Reconocimiento y respuesta innata frente al SARS-CoV-2

Una vez que el SARS-CoV-2 accede a las vías respiratorias altas e infecta células de la mucosa nasal y garganta que expresan ACE2, induce un efecto citopático derivado de su ciclo replicativo, por el cual genera los denominados patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que junto a los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs), provenientes del propio virus, activan la respuesta innata cuya finalidad es contener la infección, que tiende a progresar por el tracto respiratorio hasta los alveolos [60,61]. Tal como se describe en la **Fig. 3**, los DAMPs y PAMPs activan receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que comprende a receptores de tipo Toll (TLR), receptores de tipo gen-I inducibles por ácido retinoico (RLR) y receptores que inducen la formación de inflamosomas o receptores de tipo Nod (NLR). Respecto a los TLR, TLR2, TLR4, TLR3, TLR7 y TLR8 han sido descrito que reconocen ligandos procedentes del SARS-CoV-2 y activan la ruta NF- κ B lo que da lugar a la producción de numerosas citoquinas que incluyen IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , IFN- γ y quimiocinas como CCL-2 (MCP1) y CXCL10 (IP-10) [62–67]. Respecto a RLR se destaca RIG-I y MDA5 que reconocen ácidos nucleicos de origen viral o restos celulares y cuya activación se asocian a la producción temprana de IFNs [68,69]. Por último, DC-SIGN, L-SIGN y LSECtin reconocen regiones de la espícula del virión y son productoras, a través de la formación de inflamosomas, de IL-1 β , IL-18 y gasdermina D que, esta última, contribuye a la piroptosis como forma de muerte celular, pero mediado por la formación de poros que inducen la pérdida de la integridad celular, en lugar de fragmentarse en vesículas o cuerpos apoptóticos, lo que intensifica la inmunogenicidad de la lesión [70–72]. Las citoquinas producidas en la fase temprana de la infección inducen el reclutamiento de neutrófilos monocitos, macrófagos lo que retroalimenta la producción de más citoquinas y exacerba la lesión inicial.

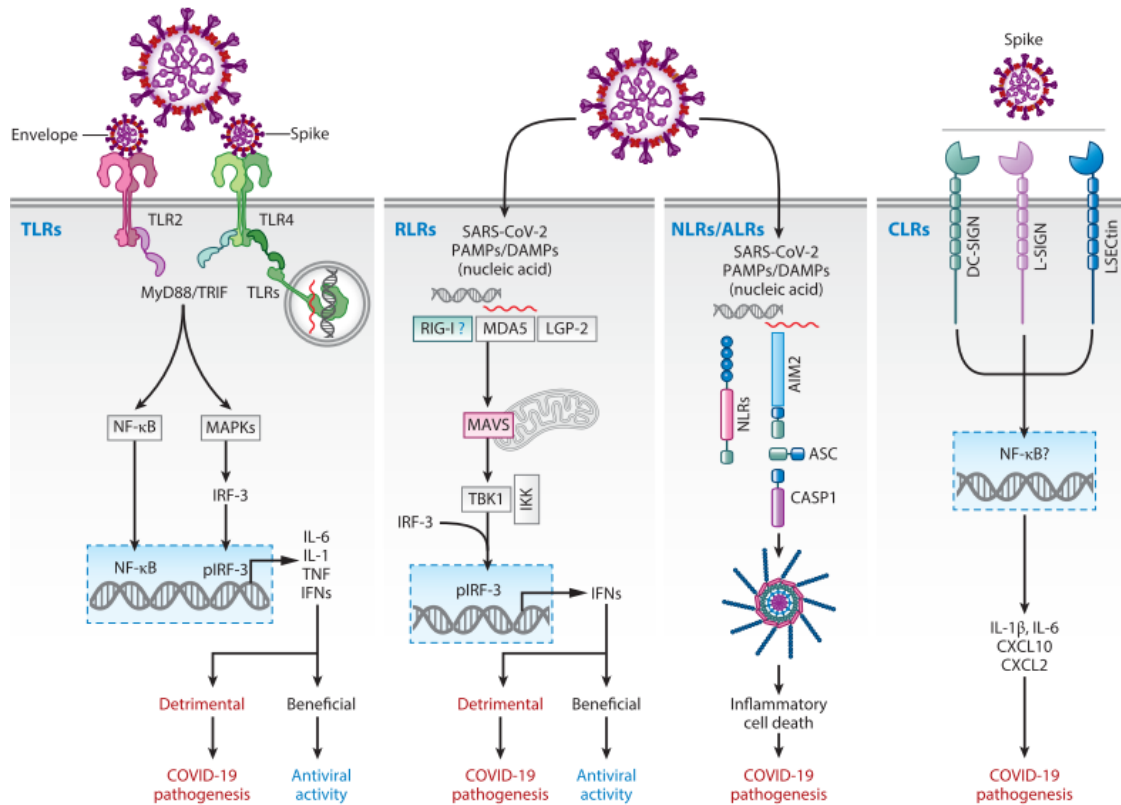


Figura 3: PRR y rutas de señalización implicadas durante la inmunidad innata contra SARS-CoV-2. Imagen obtenida de la publicación Malireddi RKS et al. [73].

Los neutrófilos son generalmente las primeras células en ser reclutadas en cualquier infección a través de la acción de la quimiocina IL-8. En la COVID-19, numerosas evidencias sugieren la importancia de los neutrófilos en la severidad de la enfermedad [74]. Una mayor activación de neutrófilos y una proporción elevada del índice neutrófilos/linfocitos están asociados a un peor pronóstico [75]. Las razones fundamentalmente son, por un lado, la secreción de mediadores que contribuyen a la respuesta inflamatoria, como por ejemplo lipocalina, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), IL-1, IL-6, IL-8 y, por otro lado, a que intensifican la lesión inicial al producir especies reactivas de oxígeno (ROS) proveniente de la trampa extracelular de neutrófilos que en los casos severos de COVID-19 se encuentra intensificada [76–78].

Los macrófagos alveolares y macrófagos derivados de monocitos son los principales responsables de la respuesta inflamatoria que se produce en el tejido pulmonar de los casos severos de COVID-19 [79]. Concretamente, se produce una densa infiltración de macrófagos derivados de monocitos, junto a una activación ineficaz de los macrófagos

alveolares. Mientras ambas células mieloides incrementan la producción de IL-8 e IL-1 β , las células epiteliales producen cada vez más IL-6 que impide la reparación del tejido pulmonar por parte de los fibroblastos. Al mismo tiempo los linfocitos T reguladores producen TGF- β , lo que promueve la fibrosis [79].

Las células dendríticas (DCs) son clave durante la presentación antigénica que dan como resultado una inmunidad adaptativa contra cualquier infección, incluida las infecciones respiratorias [80]. En el caso de los virus como el SARS-CoV-2, existe un tipo particular denominadas células dendríticas plasmacitoides (pDC) que llevan a cabo su función mediante el reconocimiento del patógeno a través de los receptores DC-SIGN, TLR2, TLR7 [65,71]. Una vez que las pDC son activadas; por un lado, migran a los órganos linfoides para la presentación antigénica a los linfocitos T, común al resto de DCs, y, por otro lado, se caracterizan por ser importantes productoras de IFNs de tipo I [81]. Sin embargo, en los pacientes COVID-19 con una evolución más desfavorable, se observa en primer lugar un retraso en la producción de interferones por parte de las pDC y posteriormente una secreción prolongada, que en conjunto resulta ineficaz contra la infección lo que resulta en un agotamiento funcional para el resto de los leucocitos; es decir, se limitan a la producción incontrolada de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas sin llevar cabo otras funciones [82,83]. Bajo este contexto, se inducen la migración de las pDC a los órganos linfoides, pero al mismo tiempo inducen la expresión del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL) que da como resultado la apoptosis de los linfocitos durante la presentación antigénica [77].

Por último, se destacan a los basófilos y eosinófilos que, aunque sean conocidos por su participación en el asma y enfermedades parasitarias, son capaces de producir moléculas antivirales y en ciertos grupo de pacientes COVID-19 están implicados en una peor afección respiratoria [84,85]. Aunque las razones no están del todo claras, hay una correlación inversa entre un peor pronóstico con el recuento de basófilos y eosinófilos; es decir, hay un menor recuentos a medida que los pacientes COVID-19 presentan peor evolución [86]. Una respuesta T helper (Th) 2 mediada por dichos granulocitos, resulta beneficiosa en las primeras etapas de la infección, pero su prolongada actividad y menor recuento contribuye negativamente, y de manera complementaria al resto de células mieloides en el pronóstico de pacientes COVID-19 [85].

3.2. Mecanismos de evasión del SARS-CoV-2

La respuesta innata contra las infecciones virales depende en gran medida de la producción de interferones de tipo I (IFNs) y, por lo tanto, de la respuesta mediada por las células NK (**Fig. 4**). En la COVID-19, se produce una ineficaz respuesta mediada por los IFNs de tipo I debido a ciertas proteínas codificadas en el genoma del SARS-CoV-2 y por la acción de miRNA codificados tanto por el propio virus como los producidos en el huésped condicionados por la infección [87,88].

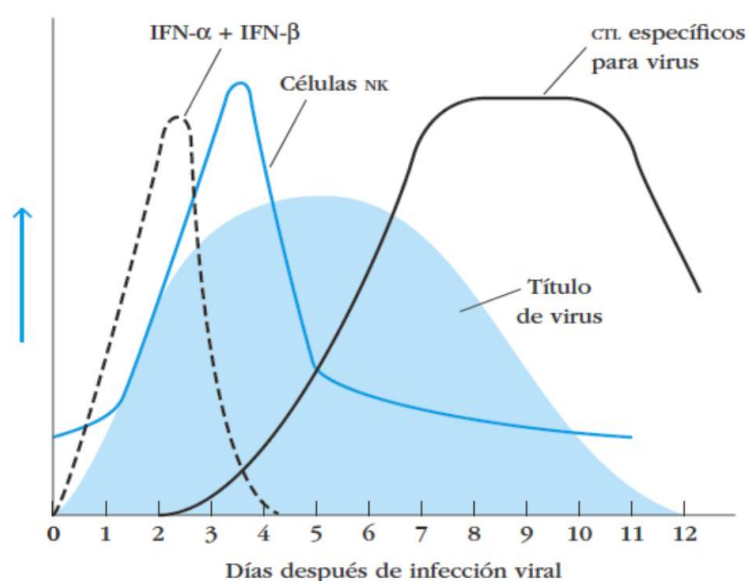


Figura 4: Evolución estándar de una infección viral en función de la secreción IFN- α e IFN- β y su relación con la actividad de las células NK, sustituida posteriormente por los linfocitos T citotóxicos. Imagen obtenida del libro KUBY, J.: Immunology (Septima edición). Nueva York: Ed. Freeman & Co. (2013).

Al igual que otros coronavirus, el genoma del SARS-CoV-2 codifica proteínas no estructurales (NSP1-NSP16) y proteínas accesorias (ORF3a/b, ORF6, ORF7a/b, ORF8, ORF9b/c, ORF10) capaces de influir en la respuesta inmune, especialmente la relacionada con la acción de IFN de tipo I [89]. Por un lado, a nivel de expresión el SARS-CoV-2 es capaz de impedir la importación al núcleo del factor de transcripción IRF-3 [90], bloquear la exportación de los transcritos correspondientes a interferones tipo I desde el núcleo [91], reprimir la traducción mediante la unión de nsp1 al canal del ribosoma lo que favorece la replicación viral mientras se afecta al mismo tiempo la traducción de IFNs y otros transcritos [92] y dificultar las modificaciones postraduccionales mediante la unión de nsp16 a U1 y U2 del espliceosoma [93]. Por otro lado, el SARS-CoV-2 afecta a la señalización asociada a la producción de IFN de tipo I, concretamente

el IFN- β , mediante el bloqueo por la proteína N al receptor RIG-I y la proteína M a los receptores RIG-I y MDA-5 [94,95]. Además influyen sobre la vía de señalización NF- κ B a través de ORF9b que bloquea la ubiquitinación de IKK γ y fosforilación de IRF-3, esenciales para inducir la expresión de IFNs [96,97]. También cabe destacar al respecto de la vía NF- κ B que ORF6, ORF8 y proteína N son capaces de bloquear a los llamados elementos de respuesta estimulados por IFN y promotores asociados a NF- κ B [98]. Por último, un prematuro codón de parada en ORF3b, con respecto al homólogo en el SARS-CoV, actúa más eficazmente a la hora de reprimir la expresión de IFNs [99]. Por otro lado, se han descrito 170 miRNA codificados de manera antisentido en el genoma del SARS-CoV-2 que potencialmente son capaces de influir en 3377 tipos de transcritos del huésped que en general están asociados principalmente con rutas de señalización de la respuesta inmune, autofagia y acción de IFN de tipo I [100,101]. Adicionalmente, los miRNA producidos por el propio huésped que se ven influenciados por la infección, modifican la respuesta inmune a favor de la replicación del virus correspondientes con el metabolismo lipídico, procesos renales, miocárdicos y fibrosis pulmonar [88,100].

Todos estos mecanismos de evasión del SARS-CoV-2 contribuyen significativamente a la patogénesis y evolución de la enfermedad, ya que durante la fase temprana de la infección, no se produce una respuesta adecuada por parte de las células NK (**Fig. 4**) y a medida que la infección se prolonga se observa un agotamiento funcional por parte de dichas células, que conlleva a que los linfocitos T citotóxicos estén sobrepasados para el control y eliminación de la elevada carga viral [77,102]. Además, la inmunidad adaptativa se ve afectada por la ineficaz acción de las pDC, al impedir la producción y acción de IFNs de tipo I tal como se describió anteriormente.

3.3. Respuesta mediada por linfocitos T frente al SARS-CoV-2

Respecto a la inmunidad adaptativa, el SARS-CoV-2 promueve durante las etapas tempranas de la infección una respuesta T helper (Th) 1 por la que se induce una inmunidad mediada por células, cuya acción se centra en la eliminación de patógenos intracelulares. Aunque al principio resulta eficaz, prolongar dicha respuesta citotóxica, como ocurre en los casos más severos, resulta contraproducente por el daño colateral a los tejidos y la exacerbación del estado proinflamatorio a través de la producción excesiva de IFN de tipo II o IFN- γ y TNF- α , que actúa como una señal de alerta para el reclutamiento/activación de macrófagos y neutrófilos, respectivamente [77]. La

producción de $\text{TNF-}\alpha$, que se correlaciona con la producción de IL-6 por parte de los macrófagos, produce un efecto negativo sobre el recuento linfocitario en sangre, lo que se conoce como linfocitopenia, debido a que ambas citoquinas son capaces de inducir apoptosis a los linfocitos T de manera directa o indirecta a través de las células dendríticas plasmacitoides [103]. La linfocitopenia constituye una de las características más importantes en los pacientes severos de COVID-19, los cuales manifiestan un prolongado tiempo de infección y en la que además se produce una sobreexpresión de marcadores asociados al agotamiento funcional de los linfocitos T CD4^+ y CD8^+ , al igual que ocurre en el caso de las células NK [104,105].

Otros subgrupos de linfocitos T que participa en la respuesta contra el SARS-CoV-2 son los linfocitos T helper foliculares (Thf) y linfocitos T reguladores (Treg). Los linfocitos Thf son productores de IL-21, cuyo efecto sobre los linfocitos B en los folículos y centros germinales es producir anticuerpos neutralizantes cada vez más específicos, así como el desarrollar de una memoria inmunológica a largo plazo. En el caso de la infección por SARS-CoV-2 (**Fig. 5**), los linfocitos Thf junto a los Th1 son relevantes a la hora de reducir la severidad de la COVID-19 [106]. Al principio, los anticuerpos que se generan son contra la proteína N, pero a medida que avanza a la tercera semana desde el comienzo de los síntomas, los anticuerpos son predominantemente contra la proteína S [107]. Sin embargo, y de manera contraintuitiva, un exceso de anticuerpos neutralizantes contra la proteína S está asociada a una mayor severidad. Tal como se muestra en la **Fig. 5**.

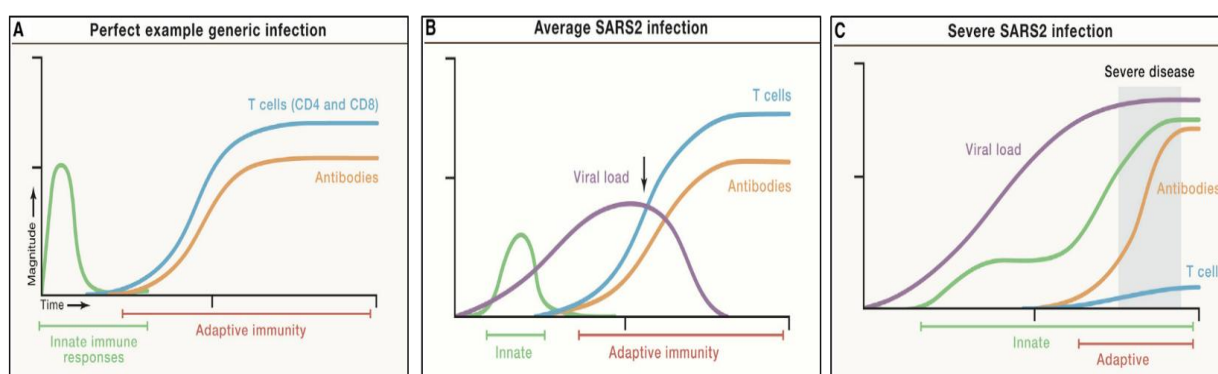


Figura 5: Evolución de los títulos de anticuerpos neutralizantes en función de la respuesta innata y adaptativa en ejemplos genéricos de infección viral, infección promedio de SARS-CoV-2 (B) y infección severa de SARS-CoV-2 (C). Imagen obtenida de la publicación Sette A et al. [109].

La descoordinación entre la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa, que impide el control de la carga viral, junto a la linfocitopenia y agotamiento funcional de los linfocitos T y células NK, constituyen las razones por las que los anticuerpos neutralizantes pierden eficacia para resolver la infección [108,109].

Los linfocitos Treg son responsables de limitar la respuesta inmune, mediante la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y TGF- β . En el COVID-19, su disminución está asociado a un peor pronóstico [110]. De hecho, cuando la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IFN- γ , IL-2, IL-6, TNF- α e IL-1 β están coordinadas con la producción de citoquinas reguladoras como IL10 o TGF- β se observa un perfil asintomático ante la infección con respecto a pacientes COVID-19, que presenta una tendencia predominante a producir altos niveles de citoquinas proinflamatorias [111].

3.4. Tormenta de citoquinas

La desregulación de la respuesta inmune durante las etapas tempranas de la infección en los pacientes COVID-19, tal como se describe en los anteriores apartados, resulta en una sobreproducción exacerbada e incontrolada de mediadores proinflamatorios, cuyo efecto se manifiesta en una serie de complicaciones respiratorias y sistémicas denominado síndrome de tormenta de citoquinas [112,113]. Aunque la heterogeneidad de los pacientes COVID-19 es notable, entre las citoquinas más destacadas encontramos IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β y GM-CSF. Adicionalmente, las quimiocinas CCL-2 (MCP1), CXCL9 (MIG) y CXCL10 (IP-10) son importantes ya que contribuyen a la activación y reclutamiento de monocitos, linfocitos T, neutrófilos y células NK [77]. De manera específica, la IL-6 ha sido comúnmente señalada, ya que en los pacientes fallecidos se observó niveles elevados con respecto a los casos de remisión de la enfermedad [114]. Sin embargo, en años posteriores se ha concluido que constituye un mejor biomarcador temprano de severidad y, por el contrario, resulta insuficiente usarlo aisladamente como predictor de mortalidad [115].

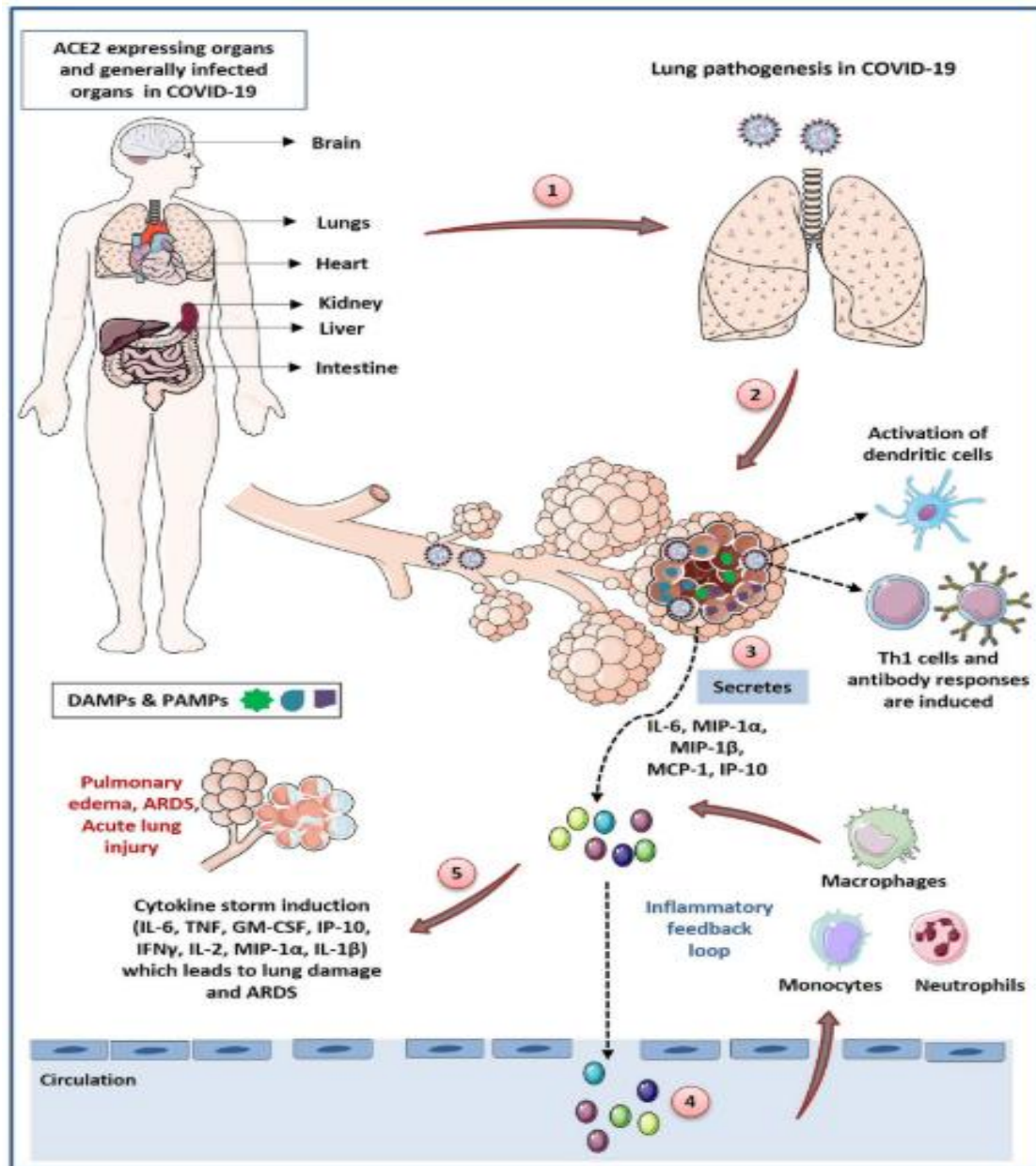


Figura 6: Representación esquemática de las principales alteraciones inmunopatogénicas que conducen a la tormenta de citoquinas en los casos severos de COVID-19. Imagen obtenida de la publicación Bhardwaj A et al. [77].

4. Manifestaciones clínicas y factores asociados a COVID-19 severo

Los síntomas más comunes de la COVID-19 son fiebre o escalofríos (83-98%), tos (50-82%), fatiga (25-44%), disnea (19-55%) y dolor muscular (11-44%). Adicionalmente, algunos pacientes pueden experimentar rinorrea, opresión torácica, dolor de garganta, náuseas, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, ageusia y anosmia, aunque estos síntomas son menos frecuentes [116]. En torno al 80% de los pacientes que recurren a los servicios de salud presentan manifestaciones leves mientras que el 15% precisa de

atención hospitalaria por neumonía moderada o severa [117]. En estos últimos casos, entre el 3-29% sufren un rápido empeoramiento de la enfermedad con el consiguiente ingreso en las UCI para el manejo de complicaciones como hipoxemia, que se asocia a un síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y fallo multiorgánico. Ambas complicaciones ocurren en el 52% de este tipo de pacientes críticos [116,118]. Otras complicaciones (**Fig. 7**) como insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal o daño hepático son menos frecuentes, pero contribuyen a la mortalidad de los pacientes críticos de la COVID-19 [110,119].

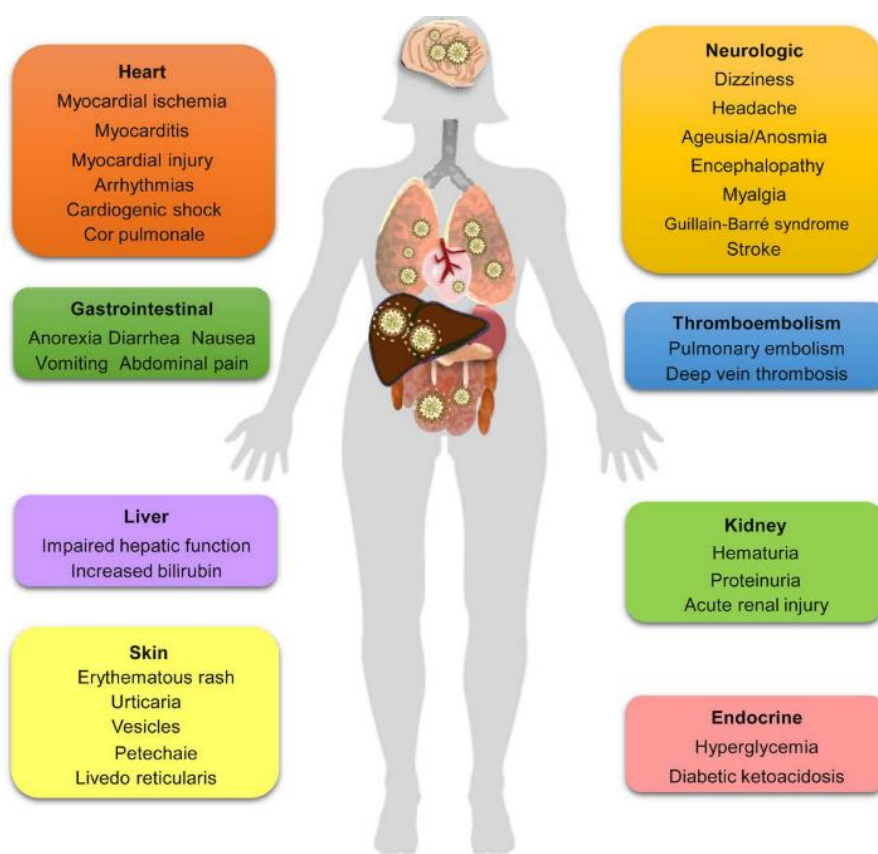


Figura 7: Manifestaciones extrapulmonares en los pacientes críticos de COVID-19. Imagen obtenida de la publicación Tsai P-H et al. [116].

La amplia heterogeneidad entre los pacientes COVID-19, que comprende desde asintomáticos a pacientes críticos es resultado de ciertos factores de riesgo que influyen en la respuesta inmune y, por lo tanto, en la progresión de la enfermedad. Entre estos factores de riesgo se destacan el género y edad, grupo sanguíneo y comorbilidades, tales como obesidad, diabetes, nefropatías, enfermedades cardiovasculares e inmunodeficiencias.

Aunque el SARS-CoV-2 infecta por igual a hombres y mujeres, los casos severos ocurren más frecuentemente en hombres. Independientemente del estilo de vida, existe razones genéticas y hormonales que lo explican. A nivel genético, es importante considerar que el cromosoma X codifica genes implicados en la inmunidad innata y adaptativa como el receptor de quimiocina CXCR3, TLR7 y ligando CD40 [120]. CXCR3 promueve la movilizar a las células NK, linfocitos B y linfocitos T y ayuda al desarrollo de una respuesta Th1 con una mejor respuesta antiviral en mujeres al expresarse doblemente [121]. TLR7 está directamente relacionado con la producción de IFN- α a través de la activación de las DCp y, por lo tanto, la expresión doble de cada uno de sus cromosomas X se correlaciona con mejor resolución de la infección [122]. Por otro lado, CD40L está implicado en la activación de macrófagos, linfocitos Thf y células endoteliales para la expresión de moléculas de adhesión [123]. Estos tres genes hacen menos frecuente que las mujeres desarrollen una respuesta inflamatoria incontrolada por la plasticidad asociada a los patrones de expresión en el cromosoma X [124]. Por otro lado, las diferencias hormonales también dan una explicación acerca del mayor riesgo de COVID-19 severo en hombres. Los andrógenos incrementan la expresión de ACE2 y TMPRSS2 en las células del epitelio pulmonar y, por lo tanto, la propagación del virus está favorecida a través del tracto respiratorio [125]. Por el contrario, los estrógenos, más presentes en mujeres, proporcionan propiedades antiinflamatorias con mejor autocontrol de la respuestas inflamatorias, e induce una menor expresión de ACE2 en las células alveolares, endoteliales, renales, entre otros [126].

La edad es un factor relevante en la severidad de la COVID-19 que además se relaciona con un mayor riesgo de secuelas en edades avanzadas [127]. De hecho, los ancianos constituyen un importante grupo de riesgo, aunque la severidad de la COVID-19 en pacientes pediátricos sigue siendo un tema controvertido. En ambos casos se ha postulado que depende de la inmunosenescencia de las personas envejecidas y, por otro lado, de la inmadurez del sistema inmune en edades tempranas que aunque en estos últimos tienden a un perfil asintomático, ciertos grupos se manifiestan altos niveles de CXCL10, GM-CSF y linfocitos B y T, que se asocian a una hiperactivación inmune que deriva en daño orgánico [128–130].

Otro de los factores determinantes en la respuesta a la infección por COVID-19 son los grupos sanguíneos, descubiertos por Karl Landsteiner en 1901. Estos grupos consisten en tres alelos denominados A, B o O codificados por el gen ABO. La

combinación de los tres alelos en los hematíes resulta en seis posibles genotipos y cuatro fenotipos posibles con o sin antígenos en el hematíe y anticuerpos en el plasma. Desde su descubrimiento, los grupos sanguíneos han mostrado relación con diversos desordenes e infecciones. Concretamente, se ha determinado su papel en la susceptibilidad o en la severidad de infecciones como la hepatitis B, *Helicobacter pylori* y enfermedades por coronavirus, incluido el SARS-CoV-2 [131,132]. Los pacientes con el grupo A muestran mayor tasa de infección en comparación a los grupos O, especialmente en las regiones donde ese grupo sanguíneo es más prevalente [133]. De la misma forma, numerosos artículos destaca la importancia respecto a la severidad, siendo mayor en los pacientes con grupo A y sobre todo se le atribuye al grupo O una menor mortalidad [134–136]. Se han propuesto numerosos mecanismos que explican la elevada susceptibilidad en relación con el grupo sanguíneo. Por un lado, los anticuerpos anti-A, presente en el grupo O y en el grupo B, es capaz de interaccionar con la proteína S y dificultar la adhesión del virión a la célula que expresa ACE2. Sin embargo, estudios posteriores han esclarecido que los anticuerpo anti-A del grupo O previenen mejor de la infección con respecto al grupo B debido a una unión más específica en relación a la clase del anticuerpo, ya que en los grupos O la clase es IgG mientras que en el grupo B es IgM [137,138]. Otro posible mecanismo se corresponde con la cualidad que tiene el SARS-CoV-2 de inducir, mientras se replica en el epitelio respiratorio, la expresión de antígenos similares a los antígenos A o B del huésped. Cuando el virión infecta a otro huésped con un grupo sanguíneo diferente, los anticuerpos presentes en el grupo O bloquean la infección al nuevo huésped; de esta forma la infección proveniente de un individuo del grupo A estará afectada negativamente cuando otro individuo del grupo B o O contraiga la infección y, al mismo tiempo, los viriones provenientes de individuos del grupo A o AB correrán mayor riesgo de infección al carecer de anticuerpos anti-A [139]. Otra explicación está relacionada con el sistema de la coagulación ya que el factor VIII y el factor de Von Willebrand inducen una mayor expresión del antígeno A y B y por lo tanto una mayor susceptibilidad [140]. Por último, ciertos tipos de polimorfismos en pacientes del grupos sanguíneos A y B presentan una mayor expresión de ACE2 que se correlaciona con riesgo de insuficiencia respiratoria asociada a la COVID-19 [141,142].

La obesidad constituye un importante factor de riesgo de la COVID-19 (**Fig. 8**). Los estudios que comparan individuos en función del índice de masa corporal superior a 30 Kg/m² con un menor índice, presentan más probabilidad de ingreso en las UCI, no

solo por la intensificación de las manifestaciones respiratorias sino también por complicaciones renales y coagulopatías [143]. Se ha observado que la respuesta Th2 y actividad de los linfocitos Treg esta alterada, correlacionando con una peor resolución de la infección[144]. Adicionalmente, la obesidad tiene una base inflamatoria donde células inmunitarias tales como macrófagos, células dendríticas y linfocitos T citotóxicos, se acumulan en la grasa visceral derivando en una incapacidad de la respuesta inmune para actuar adecuadamente junto a una producción adicional por parte de los adipocitos de citoquinas proinflamatorias importantes en la severidad de la COVID-19, como IL-6, TNF- α y CXCL-10 [110]. Se considera también que el aumento en la expresión de ACE2 por parte de los adipocitos podría constituir un reservorio para el SARS-CoV-2, lo que dificulta su eliminación y retroalimenta el fondo inflamatorio que da como resultado a un peor pronóstico en pacientes obesos [145].

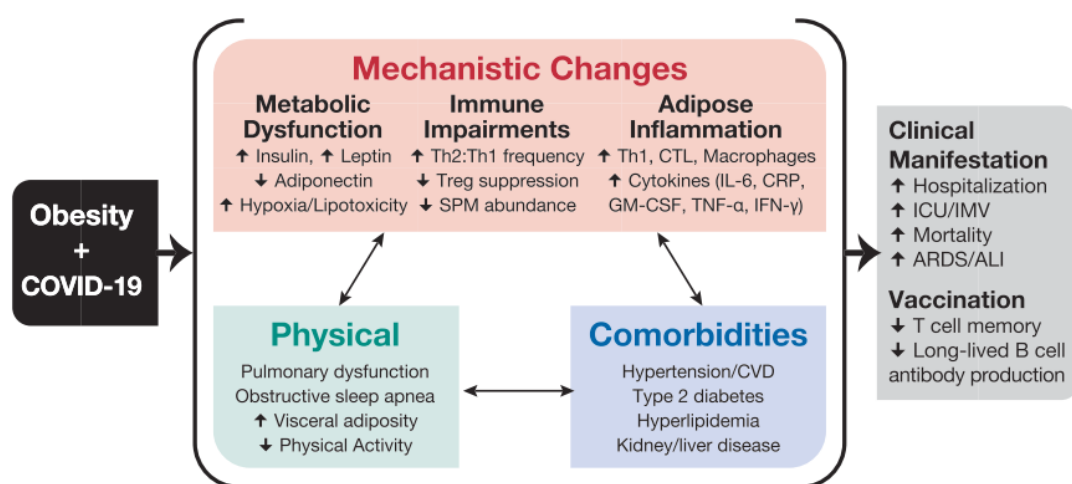


Figura 8: Manifestaciones clínicas y mecanismos de riesgo de COVID-19 en individuos con obesidad. Imagen obtenida de la publicación Popkin BM et al. [144].

La diabetes es otro de los factores que influye negativamente en el desarrollo de una respuesta inmune eficaz contra el SARS-CoV-2, debido a que se correlaciona con una menor producción de IFN- α [146]. De hecho, se piensa que el propio virus altera el metabolismo glucídico en pacientes diabéticos de tipo 2, resultando en una hiperglucemia persistente en ayunas que contribuye a la severidad y a un mayor riesgo de intubación [147]. Por un lado, la hiperglucemia incrementa la expresión y glicosilación de ACE2 en células pulmonares, renales y cardiaca, derivando en una mayor susceptibilidad a la

infección ya que el virus tiene más facilidades de infectar a la célula huésped [148,149]. Por otro lado, hay una alteración en el correcto funcionamiento de neutrófilos, macrófagos, monocitos y células NK por el cual hace que la infección no se resuelva correctamente. Esto es debido a que la glicosilación de las inmunoglobulinas afecta al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, lo que deriva en una hiperactivación de la respuesta inmune [110,150,151]. Adicionalmente, la hiperglucemia induce que los monocitos reclutados en el tejido pulmonar incrementen la producción de especies reactivas de oxígeno en relación con la estabilización del factor inducible por hipoxia 1α . Un mayor estrés oxidativo, que además viene asociado a una dislipidemia en pacientes obesos con diabetes de tipo 2, da lugar a un contexto hiperinflamatorio con una inhibición de la respuesta mediada por linfocitos T y un mayor daño tisular [152,153]. Finalmente, es importante destacar que altos niveles de glucosa dificultan la presentación antigénica entre las células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ lo que impide el correcto desarrollo de una correcta respuesta antiviral [154].

La COVID-19 frecuentemente intensifica los problemas renales previos, alterando valores sobre la tasa de filtración glomerular, creatinina, proteinuria, hematuria y urea. Como consecuencia, hay un alto riesgo de ingreso en UCI cuando el paciente presenta nefropatías previas [155]. Se sugiere que los restos celulares, como resultado de la infección y de la respuesta inmune descontrolada, son ineficazmente depurados y terminan agravando aún más la función renal [110]. Además, el riñón expresa ACE2 y, en situaciones más severas, el virus puede afectar a diferentes órganos [156]. Finalmente, cabe destacar la correlación entre pacientes que han necesitado posteriormente terapia renal sustitutiva por daño renal agudo con una alta tasa de infección del SARS-CoV-2, sugiriendo que existe un impacto a largo plazo a nivel renal [157].

Los pacientes con patologías cardiovasculares previas, tales como hipertensión, infarto de miocardio y aterosclerosis, suelen presentar un mayor riesgo de evolucionar desfavorablemente o de desarrollar secuelas post-COVID-19 [158]. El SARS-CoV-2 produce una hiperpotasemia que implica alteraciones en la conducción cardíaca, con la consiguiente disminución de la presión arterial [159]. Como mecanismo de compensación, el sistema renina-angiotensina-aldosterona es activado para restaurar la presión arterial. Sin embargo, el SARS-CoV-2 compite con la angiotensina II, cuya acumulación, mayor en los pacientes con patologías cardiovasculares, incrementa el

riesgo de trombosis, fibrosis pulmonar, inflamación sistémica y estrés oxidativo [160] (Fig. 9).

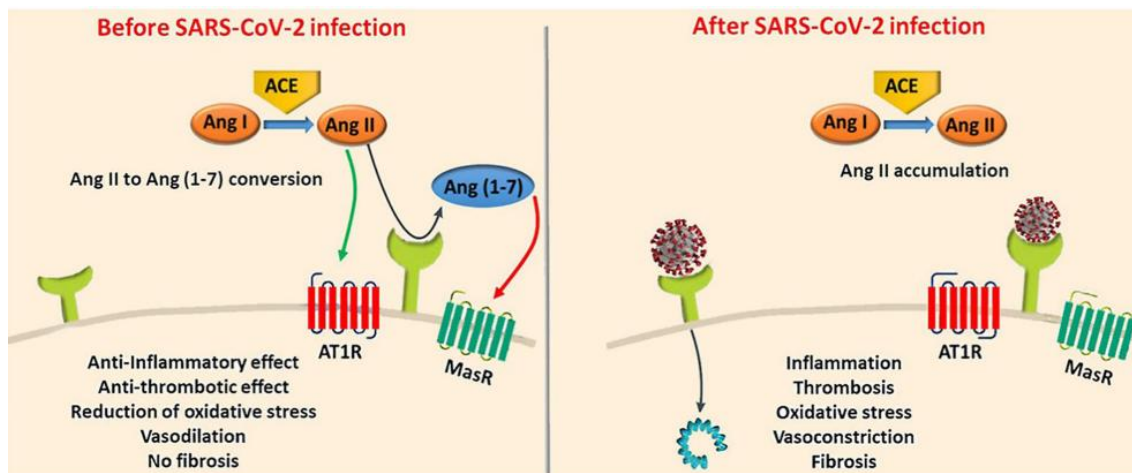


Figura 9: Papel del sistema renina-angiotensina-aldosterona en pronóstico de pacientes COVID-19 con patologías cardiovasculares previas. Imagen obtenida de la publicación Tsampasian V et al. [160].

Los pacientes inmunocomprometidos, que comprenden desde inmunodeficiencias primarias, adquiridas hasta pacientes trasplantados, constituyen un grupo de riesgo muy importante. No obstante, la evolución desfavorable puede variar entre los grupos. En el caso de las inmunodeficiencias heredadas o primarias presentan una enfermedad mucho más prolongada con un riesgo proporcional a desarrollar sepsis [161]. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida por el virus del HIV produce una mayor severidad de la COVID-19 por la aparición de infecciones secundarias oportunistas [162]. Por último, los pacientes trasplantados tanto por células hematopoyéticas o por trasplantes de órganos presentan una alta tasa de ingreso en las UCI debido al tratamiento con inmunosupresores que favorecen una mayor replicación del virus y, por lo tanto, una mayor carga viral [163].

5. Diagnóstico y pronóstico de la COVID-19

Distinguir la COVID-19 con respecto a otras enfermedades respiratorias basándose únicamente en las manifestaciones clínicas resulta complejo. A pesar de que la ageusia y anosmia esta significativamente asociada a las infección por SARS-CoV-2, su frecuencia de aparición es baja [164,165]. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son los métodos de detección por excelencia del SARS-CoV-2. En este sentido, la amplificación isotérmica proporciona excelentes resultados, pero la RT-qPCR sigue siendo la técnica “gold standard” para identificar la presencia del virus mediante el RNA viral obtenido de las vías respiratorias superiores. [166,167]. Aunque las secuencias

amplificadas han sido diversas, incluyendo las correspondientes a la proteína S, proteína N, proteína E y la polimerasa del virus, ninguna proporciona más ventaja a la hora de incrementar la sensibilidad y especificidad [168]. A pesar de la alta sensibilidad en condiciones ideales, existe un problema de falsos negativos que comprende entre el 2-58%; por lo que la utilidad predictiva en la evolución del paciente es ineficaz [169,170].

Otros métodos empleados en la detección del SARS-CoV-2 son las pruebas de antígenos y pruebas serológicas. La ventaja de las pruebas antigénicas es la facilidad y rapidez en obtener un resultado, aunque es una técnica de menor sensibilidad con respecto a las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos [171]. Por otro lado, las pruebas serológicas detectan de manera indirecta si la infección ocurrió recientemente o de manera más tardía; al menos tres semanas después del comienzo de los síntomas debido a la seroconversión de IgM a IgG. Fundamentalmente las pruebas serológicas proporcionan datos epidemiológicos precisos acerca de la prevalencia e incidencia de la enfermedad, ya que permite la detección de las infecciones en individuos asintomáticos, que igualmente generan una respuesta humoral. Sin embargo, presenta poca capacidad de detección durante la fase aguda de la enfermedad durante la primera semana de infección [172].

Respecto a la prognosis, existe una variedad de mediciones analíticas comunes, que son utilizadas en la práctica clínica con un valor predictivo de la severidad y mortalidad en diferentes enfermedades, incluida la COVID-19. Los principales parámetros analíticos alterados en pacientes hospitalizados por la COVID-19 son, por un lado, el recuento de hematíes, linfocitos, neutrófilos y plaquetas y por otro lado los niveles de dímero D, proteína C reactiva (PCR), lactato deshidrogenasa (LDH), albumina, creatinina, procalcitonina (PCT), ferritina, troponina cardíaca, péptido natriurético de tipo B e IL-6 [173]. Aunque el uso combinado de estos biomarcadores depende de la forma en que la COVID-19 puede generar complicaciones extrapulmonares, en términos generales la linfocitopenia y neutropenia junto a una elevación de transaminasas, LDH, PCR y ferritina están asociadas en general con una alta severidad de la enfermedad. De hecho, la elevación de la PCR y la disminución de albumina plasmática, indica propensión al desarrollo del síndrome de tormenta de citoquinas con una alta probabilidad de mortalidad [174–176].

Tabla 1: Variación de los parámetros analíticos en pacientes COVID-19 con una evolución desfavorable.

Hematologic	↓ Lymphocyte count
	↑ Neutrophil count
	↓ Platelet count
Biochemical	↓ Albumin
	↑ Creatinine
	↑ Lactate dehydrogenase
	↑ Cardiac troponin
	↑ B-type natriuretic peptide
Inflammatory	↓ Oxygen saturation
	↑ C-reactive protein
	↑ Ferritin
	↑ Procalcitonin
	↑ Interleukin-6
Coagulation	↑ D-dimer

Tabla obtenida de la publicación Fang FC et al. [177]

El dímero D se refiere a los productos de degradación de la fibrina, tras la disolución del coagulo durante el proceso de fibrinólisis. Se suele usar en la práctica clínica como una prueba altamente sensible para el diagnóstico de estados tromboticos como embolismo pulmonar o coagulación intravascular diseminada [178]. En los pacientes COVID-19 se emplea frecuentemente durante complicación pulmonares y para la monitorización de riesgo de tromboembolia venosa [179]. La PCR es producida en los hepatocitos junto a otras proteínas de fase aguda en respuesta a la IL-6 y potenciada por la IL-1 [180]. Constituye un importante activador de la cascada del complemento, a nivel de C1q, y promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias [181]. Como biomarcador, la PCR se emplea en la artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares e infecciones bacterianas [182]. Sin embargo, los niveles de PCR pueden variar por factores como la edad, genero, hábito de fumar y presión arterial; es decir, puede resultar un biomarcador con alta sensibilidad, pero inespecífico [183]. Respecto al COVID-19, en etapas tempranas de la enfermedad está asociado a daño pulmonar y, por lo tanto, con la severidad y mortalidad [184]. Se ha descrito una correlación inversa entre los niveles de PCR y el índice de Kirby; siendo una medida de fallo pulmonar expresado como el cociente entre la presión parcial de oxígeno arterial y la fracción inspiratoria de oxígeno

[185]. Adicionalmente puede predecir la mortalidad en combinación con una disminución de la albumina plasmática [186]. La LDH es una enzima intracelular cuya presencia está directamente relacionada con daño y muerte celular, hipoxia en el caso de fallo respiratorio, enfermedades hematopoyéticas y del sistema linfático y procesos inflamatorios en pulmón, pericardio y páncreas [187]. En pacientes hospitalizados por COVID-19, la LDH es un biomarcador relevante en relación con las complicaciones respiratorias. Se ha descrito su capacidad para predecir la mortalidad y monitorización de pacientes intubados largos periodos de tiempo, cuando se combina con la enzima aspartato aminotransferasa. Adicionalmente, puede actuar como un predictor del síndrome de distrés respiratorio agudo en combinación con la ferritina y tiosoles; una medida de estrés oxidativo [185]. La creatinina es un metabolito producido en el tejido muscular y cuya concentración plasmática permite evaluar la función renal. Aproximadamente el 22% de los pacientes COVID-19 presentan niveles anormalmente altos de creatinina y un 11,9% desarrollan daño renal agudo; que junto con la presencia de hematuria y proteinuria, incrementa notablemente la mortalidad en dichos pacientes [188]. La PCT es el pro-péptido de la hormona calcitonina, producida por las células C de la glándula tiroides. Durante una infección grave con manifestaciones sistémicas, se incrementa su producción notablemente. En la COVID-19, la PCT ha probado ser un biomarcador sensible para predecir severidad y mortalidad, en concreto cuando hay daño renal agudo, pero resulta poco específico ya que los factores que producen su incremento pueden ser variados y mantenerse en el tiempo [185,189]. La ferritina es una molécula producida por el hígado cuya función clásica es mantener la homeostasis del hierro. No obstante, posee otras funciones relacionadas con la respuesta inmune. De hecho, IL-1 β , IL-6 y TNF- α inducen una mayor producción de ferritina en sangre, formando parte de las proteínas de fase aguda cuya función es reducir el daño tisular mientras se promueve la reparación tisular. Concretamente, la ferritina contribuye a reducir el estrés oxidativo, derivado de las especies reactivas de oxígeno generadas por los macrófagos y neutrófilos [190]. En pacientes COVID-19, la ferritina se encuentra frecuentemente elevada en estadios tardíos de la enfermedad, demostrado ser eficaz para predecir el desarrollo de síndrome de distrés respiratorio agudo y estudios de supervivencia tras la extubación [176]. Sin embargo en etapas tempranas no hay elevación lo suficientemente alta, hasta que el paciente manifiesta linfocitopenia y producción incontrolada de citoquinas proinflamatorias [191]. La troponina cardíaca y el péptido natriurético de tipo B son biomarcadores comúnmente empleados para la detección precoz de disfunción sistólica

y monitorización de cardiotoxicidad en pacientes oncológicos. Durante las complicaciones cardiovasculares derivadas de la COVID-19, ambos biomarcadores tienen un valor pronóstico en la mortalidad [192]. Específicamente, cuando hay un incremento en los niveles de troponina cardíaca que se asocia a un mayor riesgo de ingreso en la unidad de cuidado intensivo y mortalidad intrahospitalaria [193]. Sin embargo, su uso se limita en algunos casos a las complicaciones cardiovasculares de la COVID-19 [194]. Por otro lado, la IL-6 ha sido ampliamente caracterizada como biomarcador temprano de severidad en pacientes COVID-19, debido a su importancia en la desregulación de la respuesta inmune que finalmente deriva en el síndrome de la tormenta de citoquinas [173]. Especialmente el uso combinado de la PCR con la IL-6 ayuda notablemente a predecir si los pacientes COVID-19 precisaran de ventilación mecánica [195]. No obstante, no resulta un biomarcador eficaz para la mortalidad [115]. Finalmente, todos los biomarcadores descritos, empleados habitualmente en la práctica clínica, pueden ayudar a la monitorización de las diferentes complicaciones que puede presentar los pacientes COVID-19 tras el ingreso en UCI, proporcionando una herramienta eficaz para reducir el alto riesgo de mortalidad (**Fig. 10**).

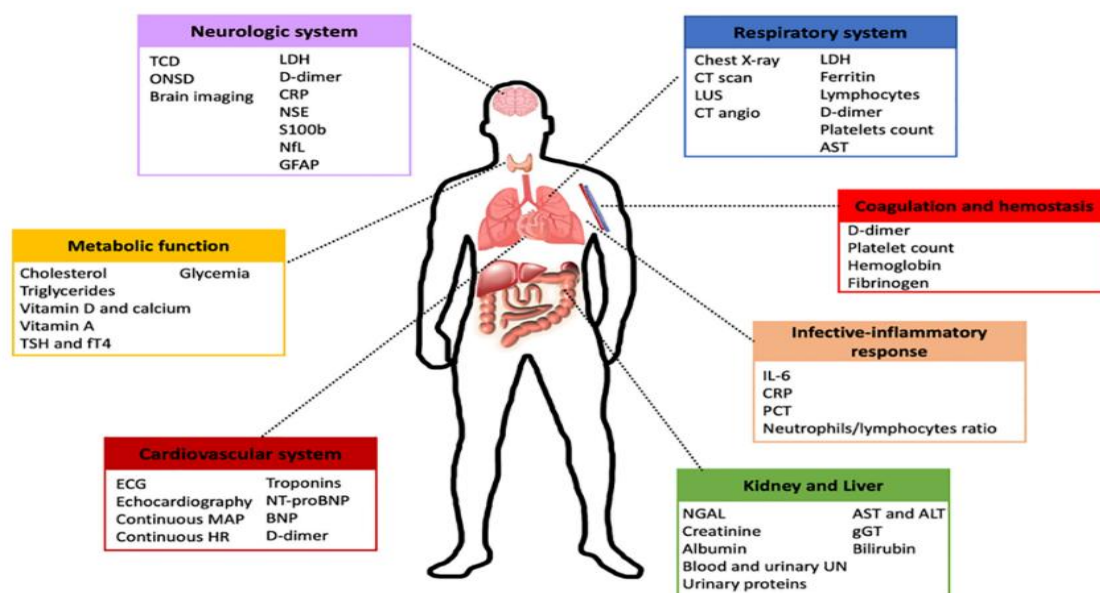


Figura 10: Biomarcadores propuesto para el manejo de pacientes COVID-19 ingresados en UCI en función de las complicaciones clínicas. Doppler transcraneal secuencial (TCD), Diámetro de la vaina del nervio óptico (ONSD), presión arterial media (PAM), frecuencia cardíaca (FC) al ingreso, tomografía computarizada (TC), lactato deshidrogenasa (LDH), proteína C reactiva (PCR), Enolasa neuronal específica

(NSE), polipéptido ligero de neurofilamentos (NfL), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), hormona estimulante tirotrópica (TSH), Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL), aspartato transaminasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), gamma-glutamyl transferasa (gGT), interleucina-6 (IL-6), péptido natriurético cerebral (BNP), nitrógeno ureico (UN), prohormona N-terminal del BNP (NT-proBNP). Imagen obtenida de la publicación Battaglini D et al. [176].

6. Tratamiento frente a SARS-CoV-2

Uno de los aspectos intensamente investigados actualmente sobre la COVID-19 es el desarrollo de tratamientos para aquellos pacientes que manifiestan síntomas clínicos severos. Los enfoques terapéuticos van dirigidos por una parte a interferir en el ciclo replicativo del virus y, por otro lado, a modular la respuesta inmune del huésped para resolver satisfactoriamente la infección. En la **Fig. 11** se muestran las principales estrategias terapéuticas basadas en el uso de diferentes tipos de inhibidores para el virus y huésped, reguladores de la respuesta inmune, anticuerpos neutralizantes y fármacos antiinflamatorios [196].

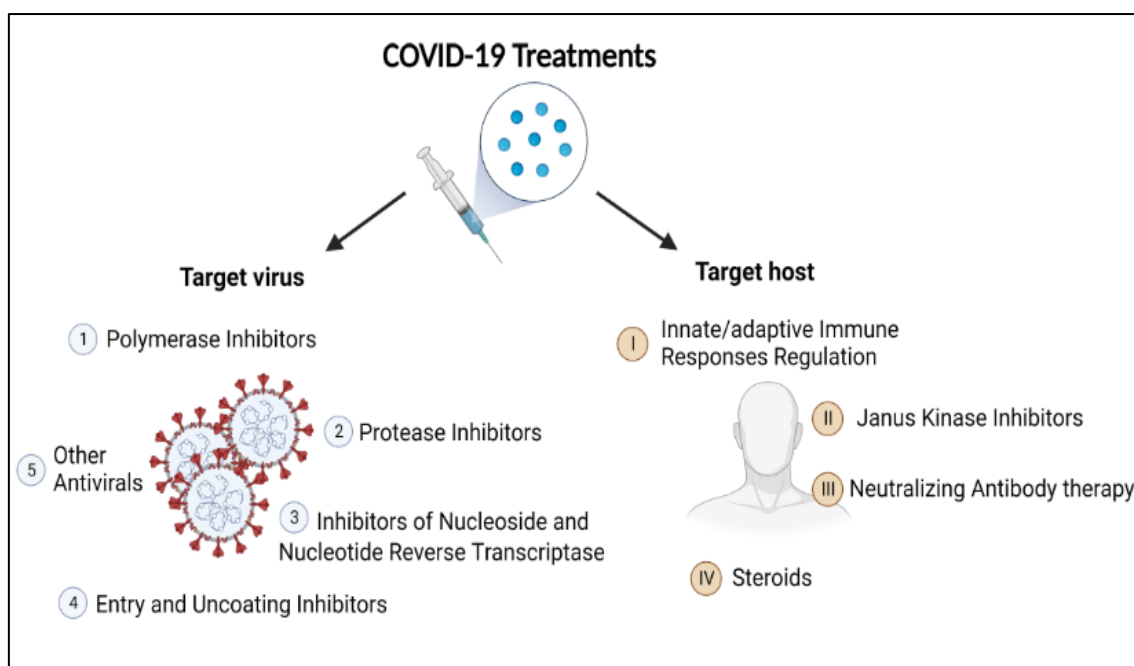


Figura 11: Principales enfoques y estrategias terapéuticas frente a la COVID-19. Imagen obtenida de la publicación Yuan Y et al. [196].

6.1. Agentes antivirales contra SARS-CoV-2

Remdesivir fue el primer agente antiviral propuesto para su uso contra el SARS-CoV-2. Es conocido por su eficacia contra el virus del Ébola y coronavirus como el SARS-CoV y MERS-CoV. Interfiere con la replicación del virus mediante la inhibición de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp). Una vez metabolizado por las células, el principio activo conocido como remdesivir trifosfato es utilizado por la RdRp durante la replicación. Una vez incorporado, el remdesivir monofosfato contiene un grupo cianuro que impide el avance de la RdRp bloqueando así el ciclo replicativo. Además, el remdesivir impide la actuación de la exonucleasa expresada por el propio virus, lo que evita los mecanismos de reparación que actúan durante la replicación del RNA viral [197]. Aunque al principio de la pandemia se aprobó su uso por parte de la FDA, hoy en día la eficacia del remdesivir sigue siendo un tema controvertido. Por un lado, hay ensayos clínicos aleatorizados que afirman una alta eficacia del remdesivir en impedir la progresión de la COVID-19 a formas severas, informándose incluso de una disminución del riesgo de hospitalización y fallecimiento a los 28 días del 87% con respecto al grupo placebo [198]. Sin embargo, otros ensayos clínicos, publicados en la misma revista, informan de lo contrario, debido a que la administración del inhibidor no supuso una mejora en las manifestaciones respiratorias de los pacientes [199]. Finalmente, se han probado otros inhibidores de la replicación del SARS-CoV-2, como el Favipiravir, pero con resultados desfavorables en cuanto a reducir la carga viral o la probabilidad de hospitalización a pesar de la alta eficacia que sugirieron otras publicaciones previas [200–202].

Al principio del ciclo replicativo del SARS-CoV-2, resulta esencial el procesamiento de ORF1ab por parte de una proteasa codificada por el propio virus. La inhibición de dicha proteasa podría constituir un método terapéutico efectivo; concretamente, se ha propuesto el uso de un fármaco ya aprobado por los organismos reguladores, como el lopinavir que se usa habitualmente para los pacientes infectados por HIV. Sin embargo, a pesar de que su uso combinado con ritonavir puede incrementar la biodisponibilidad del lopinavir, su eficacia no está asegurada para los casos de COVID-19, ya que muestra una ligera disminución de los síntomas y tiempo de estancia hospitalaria cuando se añade un agonista de IFN- β , pero en los casos más severos no resulta eficaz [196,203,204].

Los nucleósidos son un grupo de compuestos químicos que pueden actuar sobre la transcriptasa inversa del HIV, pero también presentan propiedades antivirales contra otros grupos diferentes de transcriptasas como es el caso del SARS-CoV-2. Un ejemplo es la azvudina que muestra eficacia en la eliminación temprana del virus y de hecho el organismo regulador del medicamento en china aprobó su uso en adultos para la eliminación del virus de manera precoz en estadios leves de la enfermedad [205]. Incluido dentro del grupo de moléculas, el molnupiravir ha demostrado ser eficaz a la hora de reducir a la mitad el riesgo de hospitalización en pacientes con manifestaciones moderadas de COVID-19, que presentaban factores de riesgo a evolucionar desfavorablemente [206]. De hecho, en Estados Unidos y Reino Unido se aprobó su uso para adultos con manifestaciones moderadas de la COVID-19.

Impedir la entrada del virus podría constituir un método eficaz de tratamiento contra el SARS-CoV-2 ya que interfiere en el primer paso de la replicación del virus. La amantadina se usa en ese sentido contra la gripe A. Para que el genoma del SARS-CoV-2 sea liberado del endosoma al citoplasma, es necesario el procesamiento de la proteína S en un medio ácido. La amantadina induce un medio alcalino, bloqueando así dicha etapa del ciclo replicativo del SARS-CoV-2 [207]. Los ensayos clínicos realizados hasta el momento informan de su eficacia en pacientes no vacunados con manifestaciones leves o moderadas de la COVID-19 [208].

Otros compuestos como la azitromicina, hidroxiclороquina o una combinación de ambas han sido probados en los últimos años, pero han resultado ineficaces a pesar de que los ensayos clínicos han descartado el riesgo de que la hidroxiclороquina pueda inducir una prolongación de del intervalo QT y, por lo tanto, riesgo de arritmias ventriculares graves [209].

6.2. Terapias dirigidas al huésped frente al SARS-CoV-2

El tratamiento con anticuerpos monoclonales dirigidos a la proteína S (neutralizantes), constituye una línea de investigación activa debido a la alta eficacia contra el SARS-CoV-2. Bamlanivimab resulta eficaz en reducir la carga viral y la tasa de hospitalizaciones. No obstante, no resulta efectivo para mejorar las manifestaciones clínicas y la evolución en pacientes COVID-19 hospitalizados [210,211]. La combinación de bamlanivimab con otro anticuerpo monoclonal denominado etesevimab potencia la reducción de la carga viral en pacientes ambulatorios con riesgo a

hospitalización y muerte [212]. El principal inconveniente con respecto al uso de anticuerpos neutralizantes, es la posibilidad de que las variantes desarrollen resistencia por modificaciones en la proteína S [213].

La acción de las citoquinas proinflamatorias que se asocian con la severidad de la COVID-19, son reguladas por la vía de señalización JAK/STAT. Los inhibidores de la quinasa Janus (JAK) conforma una estrategia terapéutica prometedora para numerosas enfermedades con base inflamatoria como la artritis reumatoide, mielofibrosis y policitemia vera [214,215]. En el COVID-19, los inhibidores de la JAK como baricitinib, ruxolitinib, tofacitinib y nerizutinib, han demostrado inducir una mejoría en los pacientes hospitalizados, y son actualmente utilizados para contener los efectos derivados de la hiperproducción de citoquinas proinflamatorias [196].

Finalmente, con el objetivo de reducir la respuesta inflamatoria los corticoides han probado ser fármacos eficaces en otras patologías inflamatorias. Los ensayos clínicos han demostrado que la dexametasona, budesónida, hidrocortisona y metilprednisolona, mejoran la supervivencia de los pacientes COVID-19 con manifestaciones severas [216]. Sin embargo, el control de la dosis es especialmente importante para no suprimir desfavorablemente la respuesta inmune.

CAPÍTULO II: ***JUSTIFICACIÓN***

La aparición del SARS-CoV-2 a finales del 2019, dio lugar a un problema en los sistemas de salud de la mayoría de los países del mundo. La emergencia sanitaria requería conocer aspectos detallados de la enfermedad, lo que se maximizó en el momento en que la OMS declarase la pandemia el 11 de marzo de 2020. España fue uno de los países más afectados durante estas primeras etapas de la pandemia, con un elevado número de pacientes hospitalizados e ingresados en las UCI. Desde aquel momento hasta declararse el fin de la pandemia el 5 de mayo de 2023, no ha vuelto a suceder una situación similar gracias a las medidas preventivas implementadas, a los programas de vacunación y sistemas de vigilancia. Sin embargo, lejos de erradicarse, el SARS-CoV-2 se encuentra en constante cambio y las vacunas no proporcionan una cobertura indefinida. Las diferentes formas en que la COVID-19 se manifiesta entre los pacientes supone un problema a la hora de predecir con exactitud aquellos casos con una evolución más desfavorable, ya que depende de complejos factores que condicionan la fisiopatología de la enfermedad.

Un aspecto clave de la COVID-19 es la desregulación de la respuesta inmune que induce el SARS-CoV-2 sobre ciertos pacientes de riesgo. Desde un primer momento se describió que la infección producía elevados niveles de citoquinas proinflamatorias, acompañado con linfocitopenia y un estado protrombótico, compatible con un síndrome de tormenta de citoquinas. Concretamente, IL-1, IL-6 o IFN- γ fueron las primeras citoquinas en las que se observó su incremento de acuerdo con la severidad de la COVID-19. En la práctica clínica habitual se cuantifican una serie de parámetros analíticos imprescindibles, pero resultan imprecisos y complejos a la hora de asegurar de manera exacta un pronóstico desfavorable. Las citoquinas abordan de manera específica un aspecto clave en la fisiopatología la COVID-19, ayudando tomar decisiones que ayuden a mitigar las consiguientes manifestaciones clínicas.

Por otro lado, el SARS-CoV-2 dispone de diversos mecanismos capaces de influir sobre la respuesta inmune y que juegan un papel clave a la hora de impedir la eliminación eficaz de la infección, ya que el propio virus condiciona a una respuesta ineficaz con incremento de citoquinas proinflamatorias. Por ejemplo, se destaca cómo el SARS-CoV-2 es capaz de evadir la respuesta mediada por los interferones de tipo I, esenciales a la hora de contrarrestar las infecciones virales. De manera detallada, se impiden el correcto funcionamiento de las vías de señalización que induce tanto la expresión como el efecto de los interferones de tipo I. Además, la expresión a nivel

transcripcional y traduccional en la célula huésped queda dificultada a favor de la replicación del SARS-CoV-2. Los efectores responsables de condicionar la respuesta inmune, como el caso de los interferones de tipo I, son las proteínas no estructurales del propio virus y los miRNAs generados tanto por el propio huésped, inducidos por la infección, como los propios miRNAs que expresa el propio virus. Considerando su potencial durante la patogenia de la COVID-19, su caracterización podría proporcionar una herramienta eficaz a la hora de predecir pronósticos desfavorables en pacientes COVID-19 susceptibles.

Teniendo en cuenta lo expuesto, explorar la capacidad predictiva de marcadores importantes en la fisiopatología de la COVID-19, podría proporcionar una herramienta que ayude al manejo de pacientes con riesgo de evolucionar desfavorablemente. En esta Tesis Doctoral se cuantifica a partir de plasma dos tipos de biomarcadores: citoquinas y miRNAs, con el objetivo de que puedan usarse para la prognosis de pacientes hospitalizados.

CAPÍTULO III:
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de esta Tesis Doctoral es evaluar si en cierto grupo de pacientes COVID-19 se produce una serie de mediadores que tienen asociados una respuesta inmune insuficiente para contener la infección, lo que deriva en formas severas o críticas de la enfermedad. Se plantea que la cuantificación de dichos mediadores plasmáticos, que contribuyen en parte a la fisiopatología de la COVID-19, poseen un valor pronóstico en pacientes hospitalizados.

Para dar respuesta a la hipótesis que se plantea, se considera la cuantificación de citoquinas y miRNAs para determinar cuáles podrían actuar como biomarcadores de gravedad.

Los objetivos secundarios son:

1. Describir un modelo simple, preciso y robusto basado en el perfil de citoquinas, datos analíticos y clínicos, para predecir severidad y mortalidad en base al requerimiento de ventilación mecánica en pacientes con riesgo de exitus.
2. Determinar de qué forma varían las citoquinas implicadas de manera significativa en la mortalidad y establecer grupos de citoquinas y tiempos más adecuados en determinar un fatal desenlace.
3. Identificar miRNAs implicados en la mortalidad y, así, inferir en los aspectos relevantes de la respuesta inmune que afectan a la mortalidad.

CAPÍTULO IV:
MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño y población de estudio

Se realizaron tres estudios retrospectivos de pacientes diagnosticados de COVID-19 con resultado positivo de RT-qPCR para SARS-CoV-2, ingresados en el Hospital Clínico Universitario de Valladolid (España) entre el 24 de marzo y el 11 de abril de 2020. Los resultados sobre el perfil citoquinas estuvieron conformados por 108 pacientes y los resultados relativos a la secuenciación de miRNAs por dos cohortes: una de 36 pacientes y una segunda cohorte de comparación conformada por 32 pacientes COVID-19. Se excluyeron los pacientes con otras infecciones activas o cualquier enfermedad crónica terminal y pacientes que recibieron tratamientos específicos de COVID-19. Además, se reclutaron 33 voluntarios sanos sin COVID-19 como controles. Los presentes estudios fueron aprobados por el Comité de Ética Clínica (CEIm) del Hospital de Valladolid (cod: PI 20-1717) y se actuó de acuerdo con el código ético de la Declaración de Helsinki.

Sobre los resultados del perfil de miRNAs, se empleó una segunda cohorte para comparar los miRNAs de EVs en plasma con respecto a los miRNAs libres en plasma. Esta segunda cohorte proviene de un estudio observacional multicéntrico realizado en 3 hospitales públicos españoles [217]: Hospital Universitario Infanta Leonor, Hospital Universitario Del Tajo, y Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Estos pacientes fueron reclutados entre marzo y agosto de 2020, donde se seleccionaron 32 pacientes con COVID-19 y 12 controles para su reanálisis y comparación con resultados propios. El Comité Ético del Instituto de Salud Carlos III (PI 33_2020-v3) y el comité ético de cada hospital aprobaron el protocolo del estudio, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los pacientes o representantes legales antes del reclutamiento. Esta investigación también se realizó de acuerdo con el código ético de la Declaración de Helsinki.

2. Datos clínicos y colección de muestras

Los datos demográficos, clínicos y analíticos de cada paciente fueron registrados para su uso durante el análisis estadístico. Las muestras de plasma del primer, tercer y sexto día de ingreso fueron extraídas en tubos estándar de 3,2% de citrato de sodio. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 2000xg durante 20 minutos a temperatura ambiente y el plasma resultante fue alicuotado y congelado a -80°C hasta su

uso. Para el estudio de los miRNAs, todas las muestras fueron recolectadas en la misma hora para evitar variaciones propias de los ciclos circadianos.

3. Análisis del perfil de citoquinas

La concentración de 45 citoquinas fue determinada a través del kit 45-plex Human XL Cytokine Luminex Performance Panel (R&D) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las citoquinas analizadas fueron las siguientes: BDNF, EGF, eotaxin (también conocida como CCL11), FGF-2, GM-CSF, GRO-a (CXCL1), HGF, IFN-a, IFN-g, IL-1a, IL-1 b, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-15, IL-17a (CTLA-18), IL-18, IL-1RA, IL-2, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (también conocida como CXCL8), IL-9, IP-1 beta (CCL4), IP-10 (CXCL10), LIF, MCP-1 (CCL2), MIP-1a (CCL3), NGF-b, PDGF-BB, PIGF-1, RANTES (CCL5), SCF, SDF-1a, TNF-a, TNF-b, VEGF-A, and VEGF-D.

4. Análisis del miRNoma por secuenciación de alto rendimiento, análisis bioinformático de los datos y predicción de las dianas.

El RNA total, incluidos RNA de menor tamaño, fueron aislados a partir de las EVs de plasma sanguíneo mediante el kit exoRNeasy Midi (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad y cantidad del RNA se evaluaron con el Bioanalyzer 2100 utilizando el kit Agilent RNA 6000 Nano. Las bibliotecas de RNA pequeño se construyeron con el kit NEXTFLEX Small RNA-Seq versión 4 para plataformas Illumina (PerkinElmer). Posteriormente, los RNA pequeños fueron secuenciados en el NovaSeq 6000 (Illumina) por ADM-BIOPOLIS GENOMICS en el Parc Científic de la Universitat de València (España), estimándose más de 10 millones de lecturas por muestra. Las secuencias de miRNAs de cada muestra derivadas de EVs pueden consultarse en BioStudies con el número de acceso S-BSST1192, mientras que las secuencias de miRNAs derivados de plasma pueden consultarse con el número de acceso E-MTAB-10562.

Los datos de secuenciación en bruto provenientes de archivos BCL fueron convertidos al formato FASTA mediante la herramienta *bcl2fastq* (Illumina). Se realizó la desmultiplexación para asignar las lecturas individuales a sus respectivas muestras. Para garantizar la calidad de los datos, se eliminaron las lecturas que no cumplían con el filtro de calidad de Illumina debido a llamadas de bases ambiguas. Las lecturas restantes

fueron evaluadas mediante *FastQC* (versión 0.11.3), y las secuencias de adaptadores fueron eliminadas con *cutadapt* (versión 1.13).

Se utilizó *miRDeep2* (versión 0.0.7) para el alineamiento de lecturas contra el genoma humano de referencia (GRCh38), utilizando el módulo *mapper.pl* basado en *Bowtie1*. Los criterios de retención incluyeron cero desajustes en la región semilla (*seed region*) y alineamiento en menos de cinco loci genómicos. La cuantificación de miRNAs se realizó mediante el módulo *quantifier.pl*, que implica el alineamiento contra secuencias maduras de miRNAs predefinidas y la cuantificación de lecturas dentro de un intervalo específico alrededor de estas secuencias. Esto permite determinar la expresión de los miRNAs conocidos correspondientes utilizando los precursores predefinidos en *miRBase* (versión 2.0), el cual funciona como repositorio público de todas las secuencias de miRNAs publicadas [13]. Para la cuantificación, se consideraron las lecturas que se encontraban en un intervalo de 2 nucleótidos antes y 5 nucleótidos después de las secuencias maduras de miRNAs.

Un total de 2880 miRNAs de *miRBase* fueron utilizados en el alineamiento, de los cuales 1300 miRNAs derivados de EVs plasmáticos fueron prefiltrados con conteos suficientemente altos para el análisis de expresión diferencial. El paso de prefiltrado se realizó con los parámetros recomendados en la documentación del paquete R *DESeq2*.

Los miRNAs diferencialmente expresado de manera significativa (SDE) fueron sometidos a un análisis de interacción con sus genes diana mediante los paquetes R *miRNA*tap y *ClusterProfiler*. Se seleccionaron aquellos genes diana que presentaban tres o más interacciones validadas y un valor $Q \leq 0,05$ para realizar un análisis de enriquecimiento funcional a través de las bases de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y Gene Ontology (GO) para procesos biológicos. La significancia se estableció con un valor $Q \leq 0,05$.

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico tiene en cuenta características clínicas y analíticas, perfil de citoquinas y la expresión de miRNAs con aspectos de la gravedad en pacientes hospitalizados por COVID-19, tales como intubación, fallecimiento, o supervivencia.

Dado que la mayoría de los datos continuos no seguían una distribución normal, las variables continuas se presentaron como mediana y rango intercuartílico (IQR), y se

compararon entre grupos mediante la prueba de U de Mann–Whitney o la prueba de Wilcoxon. Las variables categóricas se describieron como frecuencias absolutas y porcentajes, y se compararon utilizando la prueba de chi-cuadrado (χ^2) o la prueba exacta de Fisher, según correspondiera. En el caso de datos paramétricos, también se utilizó la prueba t de student.

La distribución de los valores obtenidos de la cuantificación de citoquinas fue evaluadas y normalizadas mediante el logaritmo en base 2 de dichos valores con el propósito de reducir una distribución asimétrica, homogeneización de las varianzas, una escala mejor interpretable, mejor idoneidad para pruebas estadística y reducir el efecto estadístico de valores extremos.

Para evaluar asociaciones preliminares entre variables clínicas, analíticas y de citoquinas con la severidad, se realizaron análisis de regresión logística binaria univariable ajustados por edad y sexo. Posteriormente, se identificaron los puntos de corte óptimos de las variables significativas ($p < 0.1$) mediante curvas ROC con sensibilidad y especificidad óptimas. Estas variables fueron dicotomizadas e incluidas en análisis multivariable, cuyo modelo fue internamente validado por el método Leave-One-Out Cross-Validation (LOOCV), con un remuestreo de 1000 individuos y una curva ROC basada en las probabilidades del modelo. Se reportaron los odds ratio (OR) y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%). Un valor de p menor a 0.05 se consideró estadísticamente significativo. Todos estos análisis se realizaron con SPSS versión 28.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

En cuanto a la evolución de las citoquinas durante los primeros días de ingreso, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) en función de la mortalidad a partir de las citoquinas que mostraron diferencias significativas entre fallecidos y sobrevivientes en el análisis univariante en al menos uno de los tres días analizados. Antes de extraer factores, se evaluó la adecuación de la muestra mediante la medida de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y la prueba de esfericidad de Bartlett para verificar la idoneidad de los datos para el análisis factorial. La solución factorial se determinó según los valores propios, que representan la varianza por cada componente. Se conservaron los factores con valores propios >1.0 , de acuerdo con el criterio de Kaiser-Guttman y el gráfico de sedimentación. La solución factorial se optimizó mediante rotación Varimax. Se calculó una puntuación basada en factores para cada componente y se estimaron puntuaciones

factoriales en todos los pacientes con COVID-19 en los días primero, tercero y sexto tras el ingreso. Para evaluar cambios en el tiempo dentro de cada grupo, se utilizó la prueba de Friedman con comparaciones múltiples de Dunn para datos no paramétricos, y análisis de varianza de medidas repetidas (RM-ANOVA) con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para datos paramétricos. La regresión logística multivariable permitió estimar la relevancia de cada componente del PCA, diferenciando entre fallecidos y sobrevivientes a los 28 días. Este modelo fue validado internamente mediante remuestreo con 1000 individuos. El área bajo la curva ROC (AUC-ROC) muestra la precisión del modelo final y de los predictores individuales. Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 28.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE. UU.). Se consideró significativo un p -valor menor a 0.05.

Respecto a los análisis de expresión diferencial de miRNAs, estos fueron normalizados usando el método DESeq2 (versión 1.38.3) y analizados mediante un modelo lineal generalizado con distribución binomial negativa, ajustado por edad y sexo. Se consideró significativo un cambio de expresión con un *fold change* (FC) ≥ 1.5 y un valor $Q \leq 0.05$ (corregido el p valor por cada false discovery rate). Los datos de expresión de miRNAs se analizaron mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) utilizando el paquete *mixOmics* de R (versión 6.22.0) para identificar patrones entre los diferentes grupos. Para la predicción de riesgo de mortalidad, se empleó un modelo de regresión de Cox multivariable con penalización LASSO, incorporando los miRNAs normalizados mediante transformación de varianza estabilizada. El análisis de mortalidad desde el ingreso hasta los 90 días se realizó mediante un modelo de riesgos proporcionales de Cox, ajustado por edad y sexo, usando los paquetes *survival* (versión 3.5.5), *pROC* (versión 1.18.2) y *survminer* (versión 0.4.9) de R. Se generaron curvas de Kaplan-Meier y curvas ROC para cada miRNA SDE, considerando un área bajo la curva (AUC) ≥ 0.85 como excelente. Todos los análisis estadísticos descritos se realizaron utilizando el paquete estadístico R (versión 4.2.3). Se consideró significativo un p -valor menor a 0.05.

CAPÍTULO V:

RESULTADOS

1. Modelo predictivo de severidad y mortalidad en pacientes COVID-19 basado en datos clínicos, analíticos y perfil de citoquinas

1.1 Variable de estudio y características de los pacientes

La variable “intubación o fallecimiento” tiene en cuenta tanto la severidad en relación a los pacientes que precisaron intubación mecánica invasiva en UCI, como también la mortalidad durante la estancia hospitalaria.

Las características clínicas según el desenlace (intubación o fallecimiento) se muestran en la **Tabla 1**. No hubo diferencias en cuanto a edad o sexo. Respecto a la comparación del grupo sanguíneo AB0, el tipo de sangre O se asoció significativamente con un menor número de pacientes intubados o fallecidos ($p = 0.035$). La comorbilidad más frecuente en ambos grupos fue la hipertensión; sin embargo, la obesidad fue la única que mostró una diferencia significativa ($p = 0.023$), siendo aproximadamente cuatro veces más común en el grupo intubado/fallecido. Entre los hallazgos de laboratorio, la glucemia, creatinina, leucocitos, neutrófilos, procalcitonina, ferritina, dímero D y LDH fueron significativamente más altos en el grupo intubado/fallecido, mientras que el recuento total de linfocitos fue menor en este grupo. En cuanto a los medidores hospitalarios, se observó que los pacientes con peores desenlaces tuvieron una estancia hospitalaria más prolongada. De los 32 pacientes intubados en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), fallecieron 12 pacientes (37.5%) durante los 28 días tras el ingreso. También se registraron 20 fallecidos en toda la muestra, lo que significa que el 60% (12/20) de los fallecimientos ocurrieron en la UCI.

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes COVID-19 según si presentaron intubación o fallecimiento.

	Intubación o fallecimiento (N=40)	No intubación ni fallecimiento (N=68)	p-valor
Edad, Años [mediana (IQR)]	72,5 (15,25)	72,5 (16,75)	0,195
Sexo masculino [n (%)]	22 (55,0)	37 (54,4)	0,953
Grupo sanguíneo, [n (%)]			
Grupo sanguíneo O	8 (20,0)	27 (39,7)	0,035
Comorbilidades, [n (%)]			
Fumador	4 (10,0)	5 (7,4)	0,631
Enfermedad coronaria	4 (10,0)	6 (8,8)	0,839
Fibrilación auricular	5 (12,5)	7 (10,3)	0,725
Diabetes	1 (2,5)	0 (0,0)	0,190
Enfermedad neurológica	1 (2,5)	1 (1,5)	0,702
Ictus	0 (0,0)	1 (1,5)	0,441
Hipertensión	20 (50,0)	30 (44,1)	0,554
Hepatopatías	2 (5)	0 (0)	0,063
Obesidad	7 (17,5)	3 (4,4)	0,023
EPOC	3 (7,5)	4 (5,9)	0,742
Nefropatías	2 (5,0)	1 (1,5)	0,281
Análítica, [mediana (IQR)]			
Glucemia (mg/dL)	174,5 (103,75)	96,0 (35,00)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,9 (0,56)	0,81 (0,21)	0,042
Bilirrubina total (mg/dL)	0,5 (0,57)	0,5 (0,3,0)	0,292
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	7,87 (7,83)	6,12 (3,45)	0,001
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	0,61 (0,55)	1,00 (0,51)	<0,001
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	6,74 (7,38)	4,19 (2,99)	<0,001
Procalcitonina (ng/ml)	0,23 (0,40)	0,06 (0,14)	<0,001
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	211,5 (107,5)	199,0 (115,0)	0,611
Proteína C reactiva (mg/L)	97 (153,00)	78 (99,75)	0,166
Ferritina (µg/L)	1456 (1246,50)	646 (864,75)	0,003
Dímero D (mg/L)	1594,5 (9282,0)	630 (564,5)	<0,001
LDH (mmol/L)	365 (179)	300 (720)	<0,001
Medidores hospitalarios, [mediana (IQR)]			
Días de hospitalización	22 (28)	8 (6)	<0,001
Días en UCI	14 (13)	0 (0)	-

Las variables continuas se representan como [mediana (rango intercuartílico, IQR)]; las variables categóricas se representan como [n (%)]. EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica; PCR: Proteína C Reactiva; UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

1.2. Análisis del perfil de citoquinas

De las 37 citoquinas que alcanzaron la tasa mínima requerida de detección del 20%, solo seis mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Tabla suplementaria S1**). La IL-15 fue la única citoquina cuyos niveles plasmáticos fueron más bajos en el grupo con peores desenlaces clínicos. Por el contrario, las citoquinas HGF, MCP1, PDGF-BB, PIGF1 y VEGF-A se encontraron elevadas en el grupo intubado/fallecido (**Fig. 12**). Los niveles fueron aproximadamente el doble en el caso de las citoquinas HGF, PDGF-BB y VEGF-A, y seis veces mayores en el caso de la citoquina PIGF1.

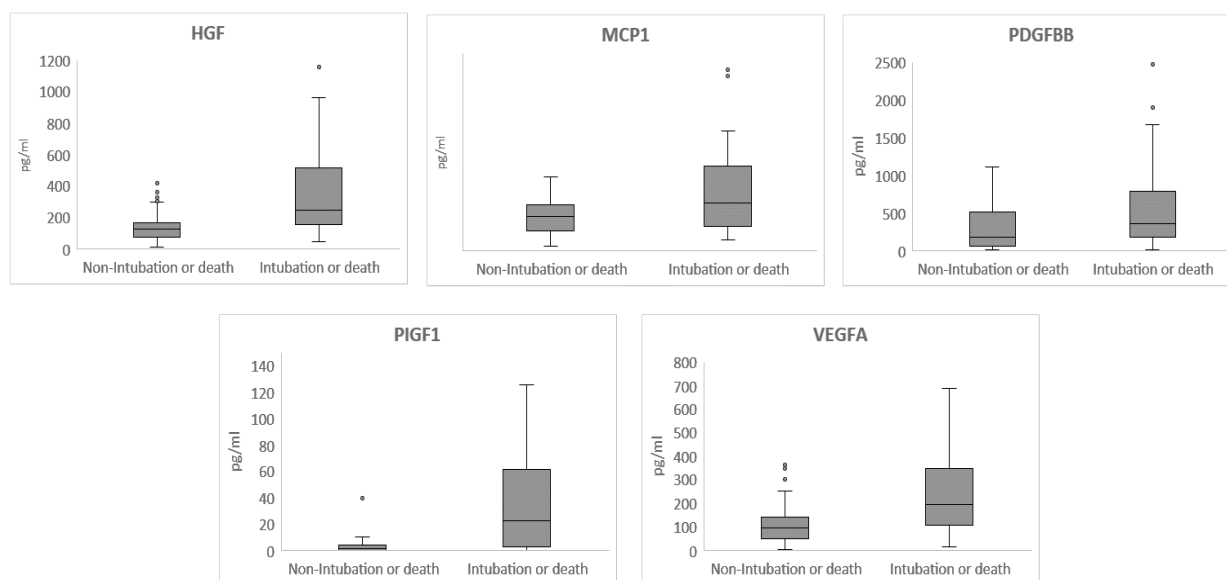


Figura 12: Diagrama de cajas que muestra los niveles de citoquinas con diferencias estadísticamente significativas según intubación o fallecimiento.

1.3. Factores de riesgo asociados a desenlace clínico desfavorable en pacientes hospitalizados con COVID-19

Se realizó un análisis logístico univariante de cada variable clínica, analítica y de citoquinas (**Tablas suplementaria S2 y S3**). Entre las variables clínicas significativas, tres mostraron resultados estadísticamente significativos. El grupo sanguíneo O presentó una asociación protectora ($OR = 0,746$), mientras que la diabetes ($OR = 2,97$) y la obesidad ($OR = 5,36$) se relacionaron directamente con un mayor riesgo de intubación o fallecimiento por COVID-19. Además, las variables analíticas que se asociaron significativamente con los peores desenlaces; es decir, con el riesgo de intubación o fallecimiento fueron: glucemia, leucocitos, neutrófilos, procalcitonina, PCR, ferritina,

dímero D y LDH. En cuanto al perfil de citoquinas, cuatro de las seis citoquinas que fueron significativas en la comparación previa se asociaron con la variable de estudio. La HGF fue la citoquina que mostró el mayor riesgo en el análisis univariante ($OR = 2,12$), seguida de MCP1 ($OR = 1,6$) y PDGF-BB ($OR = 1,21$). La IL-15 fue la única citoquina con una OR menor a 1, lo que indica que sus niveles eran más bajos en el grupo de estudio en comparación con los pacientes que no presentaron desenlaces clínicos adversos.

En la regresión logística multivariante, las variables continuas significativas generalmente mostraron una OR cercana a 1 debido a las diferencias en las variables cualitativas como obesidad y diabetes. Con el fin de proporcionar resultados aplicables en los servicios de urgencias, las variables continuas significativas fueron dicotomizadas (**Tabla 3**). A partir de estas variables dicotomizadas, se construyó un modelo multivariante siguiendo un método automático de eliminación hacia atrás, que se presenta en la **Tabla suplementaria S4** y se representa en la **Fig. 13**. El grupo sanguíneo O fue la única variable clínica significativa en el modelo multivariado ($OR = 0,073$), convirtiendo a los grupos sanguíneos no O en el segundo factor de riesgo más importante ($OR = 13,7$).

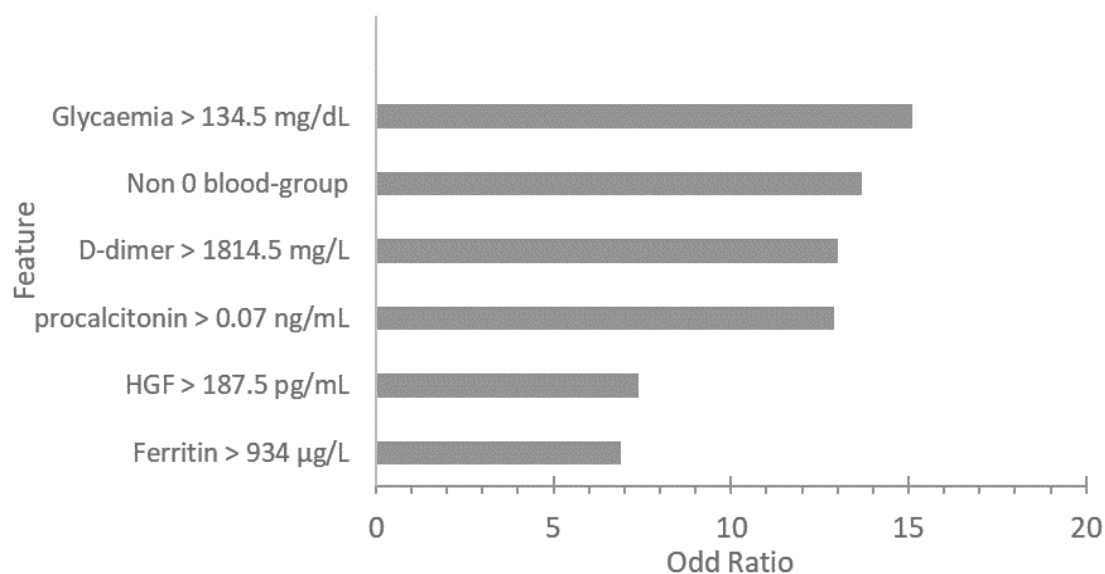


Figura 13: Análisis multivariante que muestra la contribución de cada factor de riesgo al riesgo de intubación o muerte.

Los valores anormales de glucemia (OR = 15,09), dímero D (OR = 13), procalcitonina (OR = 12,92) y ferritina (OR = 6,91) fueron las variables analíticas que, al superar los valores de corte al inicio de la infección, mostraron un mayor riesgo de desenlace desfavorable. La única citoquina que resultó estadísticamente significativa fue la HGF (OR = 7,38), con repercusiones similares a las variables analíticas.

Tabla 3. Estimación del valor de corte de las variables analíticas mediante curva ROC

	Punto de corte	Valores de ref.	Sens (%)	Espec (%)	AUC	CI 95%	
Glucemia	134.5mg/dL	70-110	82,5	85,3	89,0	82,5	95,5
Creatinina	1.19 mg/dL	0.7-1.1	32,5	91,2	61,7	50,5	72,9
Leucocitos	9.94 x10 ⁹ /L	4.5-11.5	37,5	95,6	68,4	57,5	79,4
Linfocitos	0.8 x10 ⁹ /L	1.3-4	5,0	98,5	23,2	12,8	33,6
Neutrófilos	5.48 x10 ⁹ /L	2-7.5	67,5	73,5	75,2	65,3	85,1
PCT	0.07 ng/ml	<0,1	97,4	54,8	78,2	69,3	87,1
PCR	145 mg/L	<10	38,5	80,9	58,1	46,5	69,6
Ferritina	934 µg/L	<307	72,0	61,8	70,3	57,4	83,2
Dímero D	1814.5mg/L	<120	67,0	78,5	74,6	64,0	85,3
LDH	326 nmol/L	<225	70,0	76,5	71,5	61,1	82,0
HGF	187.5 pg/ml	-	72,5	72,1	75,2	65,7	84,8
IL-15	29.6 pg/ml	-	22,5	80,9	39,0	27,4	50,7
MCP1	56.77 pg/ml	-	42,5	86,8	62,6	51,2	74,0
PDGFBB	182.5 pg/ml	-	77,5	52,9	61,7	50,7	72,8

AUC, Área bajo la curva ROC; IC, Intervalo de confianza; Sens. Sensibilidad; Espec, especificidad.

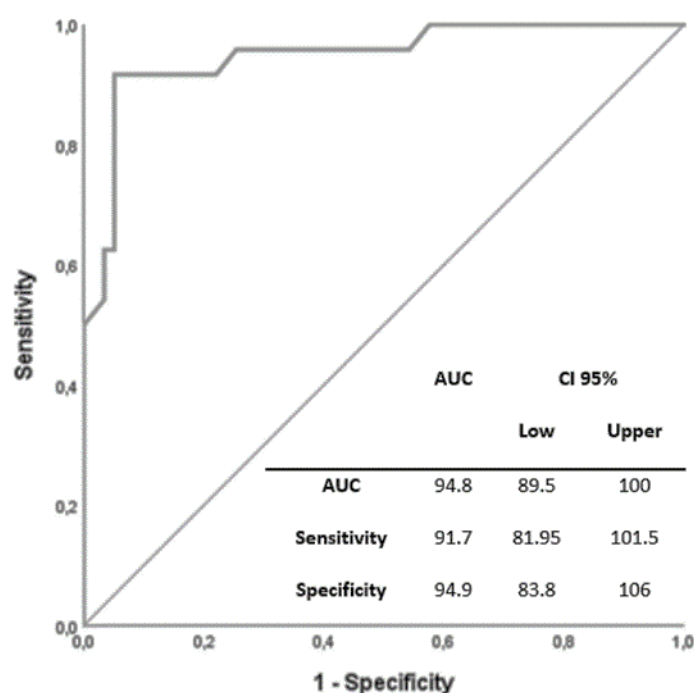


Figura 14: Validación interna utilizando el AUC (Área bajo la curva ROC). IC, Intervalo de confianza.

La validación interna se realizó utilizando el AUC para determinar la sensibilidad y especificidad del modelo multivariante (**Fig. 14**). El modelo mostró una precisión del 94.8%, una sensibilidad del 91.7% y una especificidad del 95%. Además, realizamos otra validación interna siguiendo el método de remuestreo (**Tabla suplementaria S5**). Esta retrovalidación consideró una muestra de 1000 pacientes y mostró resultados estadísticamente significativos en las seis variables incluidas en el modelo predictivo multivariante (grupo sanguíneo O $p = 0.031$; glucemia $p = 0.003$; procalcitonina $p = 0.001$; ferritina $p = 0.013$; dímero D $p = 0.008$; HGF $p = 0.003$) y presentó bajo sesgo al abordar el optimismo y el sobreajuste. Esto confirmó los resultados sólidos y robustos previamente obtenidos.

2. Evolución temporal de los perfiles de citoquinas asociados con la mortalidad en pacientes hospitalizados por COVID-19

2.1 Variable de estudio y características de los pacientes

La variable de estudio es la mortalidad a los 28 días posterior al ingreso hospitalario. En la **Tabla 4** se observa las características basales de los pacientes. No hubo diferencias en cuanto a género y comorbilidades entre los grupos. Considerando las variables analíticas, los pacientes fallecidos presentaron niveles más altos de glucemia, creatinina, leucocitos, neutrófilos, procalcitonina, PCR, dímero D y LDH. No se observaron diferencias significativas respecto a los medidores hospitalarios que atienden a porcentaje de pacientes con ventilación mecánica invasiva, duración de la estancia hospitalaria y duración en UCI.

2.2. Análisis del perfil de citoquinas

Las comparaciones del perfil de citoquinas entre el grupo de fallecidos y sobrevivientes al primer, tercer y sexto día de ingreso muestran que 10 citoquinas presentaron diferencias significativas en alguno de los tres momentos de la recogida de muestra. En el día de ingreso (**Tabla suplementaria S6**), se observaron diferencias significativas en los niveles de HGF, IL-2, IL-1a, IL-15 y VEGFA. IL-15 e IL-2 fueron las únicas citoquinas cuyos niveles se redujeron significativamente a la mitad en el grupo de fallecidos a los 28 días. El resto de las citoquinas se incrementaron significativamente en este grupo. Específicamente, IL-1a y VEGFA cuadruplicaron y duplicaron sus niveles, respectivamente. En el tercer día de ingreso (**Tabla suplementaria S7**), se encontraron

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes de acuerdo con la mortalidad a los 28 días de ingreso.

	Fallecidos a los 28 días (N=20)	Sobrevivientes (N=88)	p-value
Edad, Años [mediana (IQR)]	73,5 (14)	67 (17)	0,017
Sexo masculino [n (%)]	12 (60)	47 (53,4)	0,593
Comorbilidades, [n (%)]			
Fumador	4 (20,0)	5 (5,7)	0,059
Enfermedad coronaria	2 (10,0)	8 (9,1)	1,000
Fibrilación auricular	4 (20,0)	8 (9,1)	0,229
Diabetes	5 (25,0)	14 (15,9)	0,340
Enfermedad neurológica	1 (5,0)	1 (1,1)	0,337
Ictus	0 (0,0)	1 (1,1)	1,000
Hipertensión	11 (55,0)	39 (44,3)	0,460
Hepatopatías	1 (,05)	1 (1,1)	0,337
Obesidad	2 (10,0)	8 (9,1)	1,000
EPOC	2 (10,0)	5 (5,7)	0,611
Nefropatías	2 (10,0)	1 (1,1)	0,087
Analítica, [mediana (IQR)]			
Glucemia (mg/dL)	198 (227,00)	106 (67,25)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,995 (0,86)	0,815 (0,23)	0,007
Bilirrubina total (mg/dL)	0,5 (0,58)	0,5 (0,39)	0,482
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	8,16 (10,23)	6,41 (3,72)	0,042
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	0,72 (0,74)	1 (0,56)	0,185
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	7,13 (9,59)	4,73 (3,27)	0,016
Procalcitonina (ng/ml)	0,30 (0,570)	0,09 (0,195)	<0,001
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	195 (95,25)	208 (117,00)	0,512
Proteína C reactiva (mg/L)	160 (190,0)	76 (95,5)	0,003
Ferritina (µg/L)	1024,5 (1137,25)	671,0 (1107,00)	0,126
Dímero D (mg/L)	2029 (23629,25)	711 (769,50)	0,015
LDH (mmol/L)	385 (183,25)	306 (96,25)	0,002
Medidores hospitalarios, [mediana (IQR)]			
Ventilación mecánica [n (%)]	12 (60,0)	21 (23,9)	0,122
Días de hospitalización	15,5 (11,75)	11,0 (13,50)	0,153
Días en UCI	17,5 (8,75)	20,0 (19,50)	0,253

IQR, rango intercuartílico; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; PCR, proteína C reactiva; UCI, unidad de cuidados intensivos.

diferencias entre los grupos en BDNF, eotaxina, IL-18 y nuevamente en los niveles de HGF e IL-15. En los fallecidos, los niveles de HGF e IL-18 fueron significativamente más altos, donde HGF triplicó los niveles en comparación con los sobrevivientes. Por otro lado, los niveles de BDNF, eotaxina e IL-15 fueron significativamente más bajos en este grupo.

Finalmente, en el sexto día de ingreso (**Tabla suplementaria S8**), las citoquinas significativamente elevadas en los fallecidos fueron SCF, MCP-1, IL-18, VEGFA y HGF. La excepción volvió a ser IL-15, que mostró apenas variación a lo largo del tiempo, y cuyos niveles en fallecidos permanecieron a la mitad de los de los sobrevivientes. IL-18 aumentó sus niveles en comparación con el día 3 de ingreso; y VEGFA, que ya había duplicado significativamente su nivel en el primer día triplicó sus niveles en los fallecidos al sexto día. Sin embargo, HGF destaca como la única citoquina que permaneció significativamente elevada en el grupo de fallecidos a lo largo de los tres momentos de medición, alcanzando su pico máximo y mayor diferencia respecto a los sobrevivientes en el sexto día de ingreso.

2.3. Análisis de componentes principales

La prueba de Kaiser-Meyer-Olkin (0.7) y la prueba de esfericidad de Bartlett ($p < 0.001$) indicaron que los datos resultan idóneos para el PCA (**Tabla suplementaria S9**). El PCA resultante dio lugar a tres componentes con valores propios superiores a uno que describen las relaciones entre los niveles de grupos de citoquinas en pacientes COVID-19. Los tres componentes explicaron el 66,09% de la varianza total. PC1, PC2 y PC3 representaron el 32,63%, 19,14% y 14,32% de la varianza, respectivamente. PC1 está compuesto por IL-15, IL-2 y BDNF; PC2 por HGF, MCP-1, IL-18, eotaxina y SCF; y PC3 por IL-1a y VEGFA. La **Fig. 15** muestra un gráfico de puntuación tridimensional que ilustra la distribución de las citoquinas en los componentes principales. Los algoritmos de los componentes principales se aplicaron a todos los pacientes y las puntuaciones calculadas se guardaron como nuevas variables denominadas PC1, PC2 y PC3 en el primer, tercer y sexto día de ingreso.

Además, los algoritmos de los componentes principales se aplicaron al grupo control y las puntuaciones de PCA (PC1, PC2 y PC3) se compararon entre los pacientes con COVID-19 y los sujetos sanos negativos para SARS-CoV-2 en el día del ingreso. Las puntuaciones calculadas fueron más altas en los pacientes con COVID-19 que en los

controles: PC1 ($t(52.26) = 3.53$; $p = 0.001$); PC2 ($U = 988.00$; $p = 0.005$); PC3 ($U = 1111.00$; $p = 0.031$). Estos valores nos permiten confirmar que dichas citoquinas son diferentes entre sujetos infectados y sanos, lo que resalta la importancia de estas citoquinas en la infección por COVID-19.

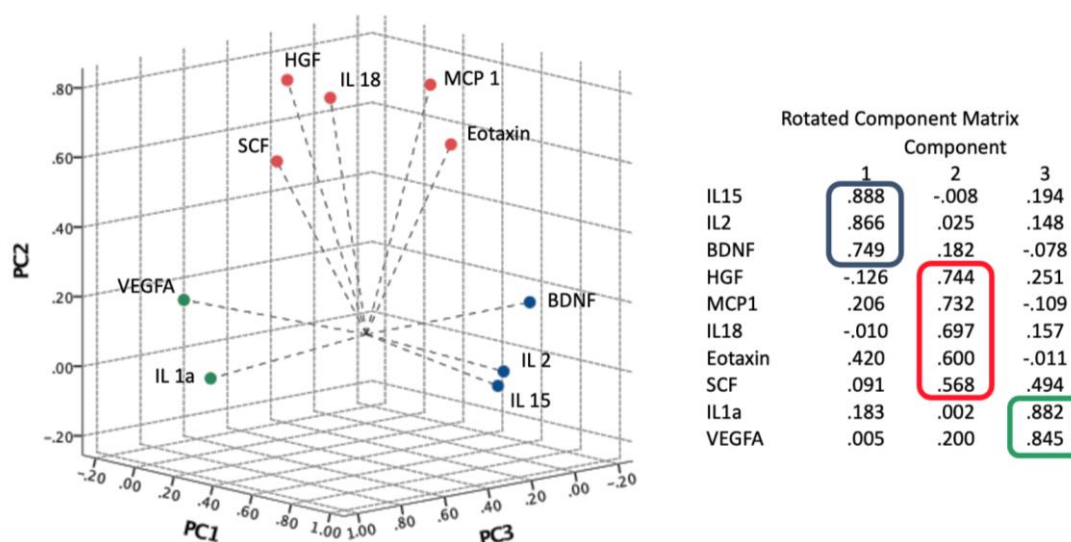


Figura 15: Diagrama de componentes en el espacio rotado. Resultados del análisis de componentes principales (ACP) y del método de rotación Varimax con normalización Kaiser. Los tres componentes representaron el 66,09% de la varianza total.

2.4. Puntuación de los componentes principales en sobrevivientes vs. no sobrevivientes

La **Fig. 16** muestra las puntuaciones PC1, PC2 y PC3 al primer, tercer y sexto día de ingreso para pacientes supervivientes y fallecidos a los 28 días. En la **Fig. 5A** se observan diferencias significativas entre ambos grupos. La mortalidad se asoció a puntuaciones más bajas de PC1 y más altas de PC2 y PC3. Esto indica que las puntuaciones más altas en PC1 son protectoras, mientras que PC2 y PC3 representan factores de riesgo. En contraste con PC3, que sólo está significativamente elevada en los pacientes fallecidos en el primer día; las diferencias entre supervivientes y fallecidos en las citoquinas de PC1 y PC2 se intensificaron con el tiempo. La **Fig. 5B** muestra que en los primeros 6 días de hospitalización, la puntuación media es estable y significativamente más baja en los pacientes que sobrevivieron que en los que fallecieron con, además, una tendencia significativa creciente para PC2.

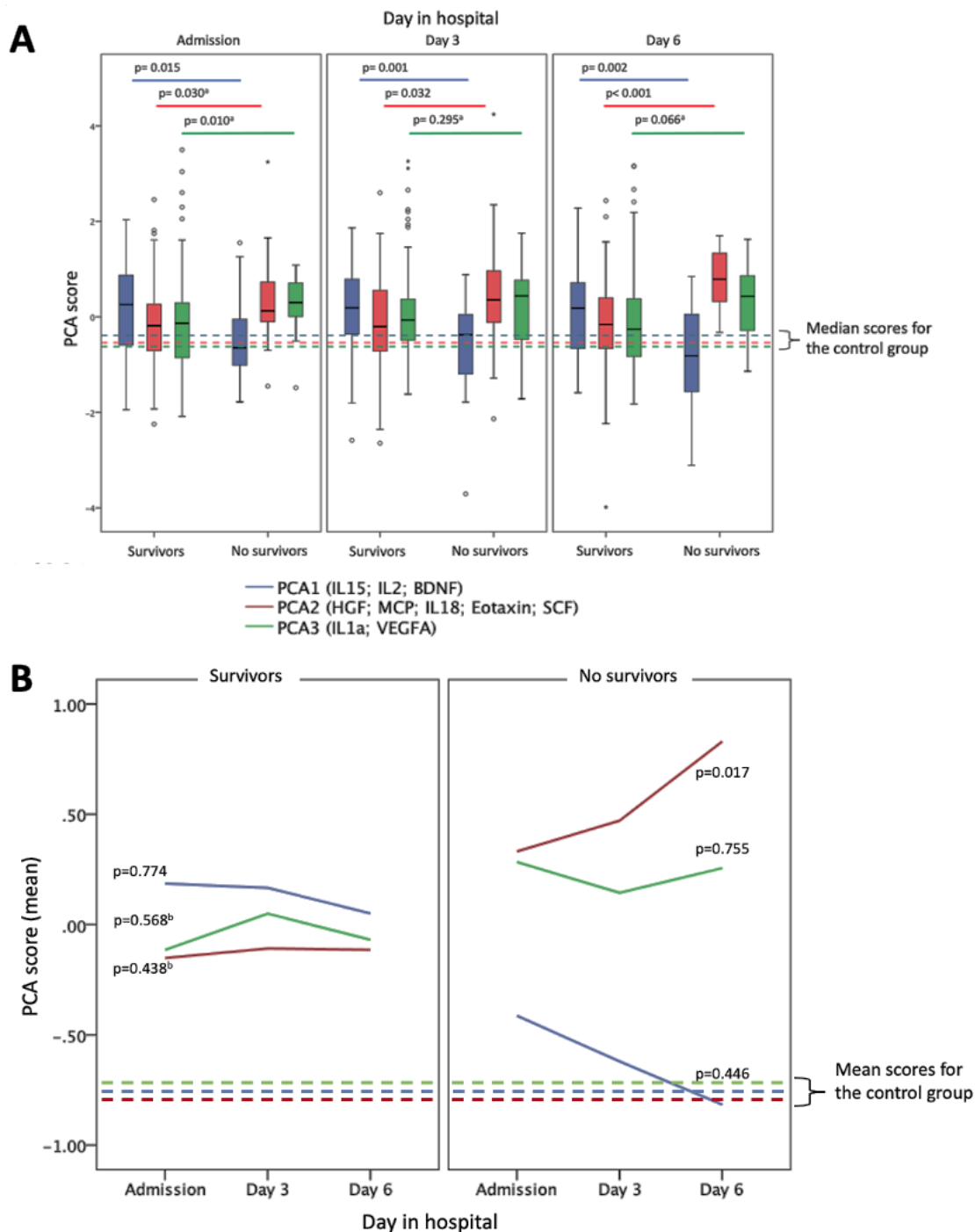


Figura 16: Puntuaciones PC para pacientes COVID-19 (supervivientes y fallecidos) y controles al aplicar los estimadores de cada PC. En azul los grupos PC1 IL-15; IL-2 y BDNF. En rojo PC2 grupos HGF; MCP1; IL-18; eotaxina y SCF. En verde PC3 grupos IL-1a y VEGFA. (A) Box-plots muestra la diferente contribución de cada uno de los factores obtenidos en el análisis de componentes principales para supervivientes y fallecidos, mostrando, además, tres momentos en la evolución de la enfermedad (primer, tercer y sexto día de ingreso de los pacientes). (B) Muestra que en los 6 primeros días de hospitalización, la puntuación media es estable y significativamente inferior para los pacientes que sobrevivieron que para los que fallecieron. Además, se observa una tendencia creciente de este marcador en los pacientes que no sobrevivieron. Las tendencias a lo largo del tiempo de las puntuaciones de PC para supervivientes y no supervivientes se calcularon por separado mediante RM-ANOVA o la prueba de Friedman.

2.5. Análisis multivariante de los componentes principales asociados a la mortalidad a 28 días

El sexo y la edad no fueron variables significativas en el modelo final ajustado. El análisis de regresión logística (**Tabla suplementaria S10**) mostró que, en el día del ingreso, solo la combinación de citoquinas definida por el PC3 fue significativa [OR: 2.35, IC95%: 1.09–5.06, $p = 0.029$].

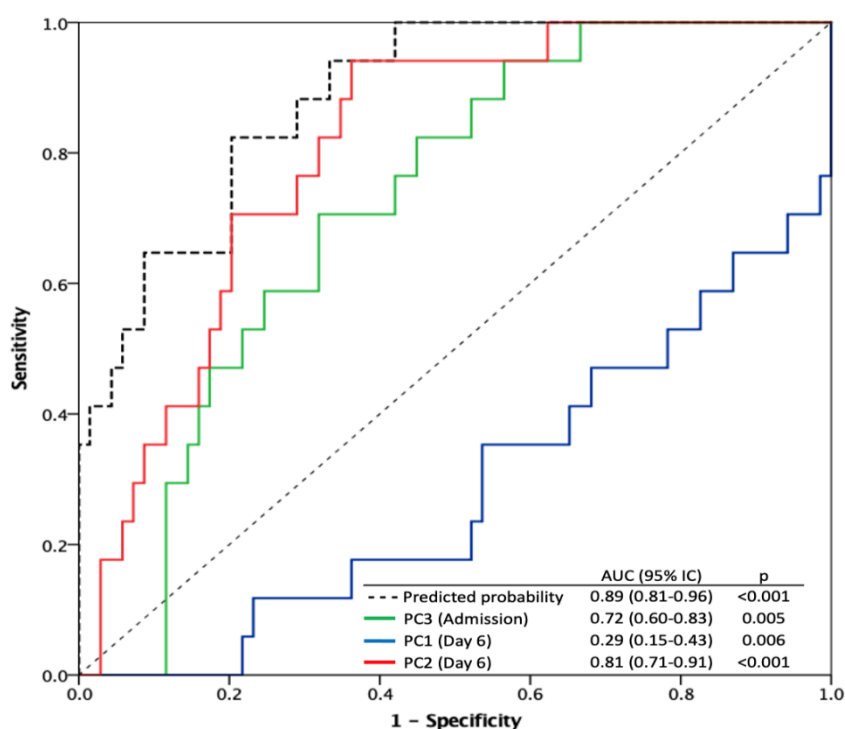


Figura 17: Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para la probabilidad predicha del modelo de regresión logística y los predictores significativos de mortalidad a 28 días (PC3 en el día del ingreso, PC1 y PC2 en el sexto día después del ingreso).

En contraste, PC1 y PC2 fueron significativos en el sexto día de ingreso, donde las citoquinas del PC1 representaron un factor protector frente a la mortalidad a los 28 días [OR: 0.273, IC95%: 0.12–0.64, $p = 0.003$], mientras que el PC2 se identificó como el principal factor de riesgo [OR: 5.24, IC95%: 2.03–13.48, $p = 0.001$]. Las curvas ROC de los factores significativos y la probabilidad predicha para el modelo final de regresión logística se muestran en la **Fig. 17**. El área bajo la curva (AUC = 0.89, IC95% = 0.81–0.96, $p < 0.001$) muestra una buena capacidad de discriminación del modelo.

3. Perfil de miRNAs en vesículas extracelulares de pacientes COVID-19 como predictores de la mortalidad.

3.1 Variable de estudio y características de los pacientes

Se incluyeron un total de 36 pacientes con COVID-19 grave y 33 controles, para el análisis de expresión diferencial de miRNAs en EVs derivadas de plasma. Las características epidemiológicas y clínicas se describen en la **Tabla 5**.

3.2. Perfiles de miRNAs derivados de vesículas extracelulares plasmáticas y libres en plasma entre pacientes con COVID-19 grave y controles

El análisis PLS-DA reveló una clara clasificación entre los grupos de COVID-19 y controles basada en la expresión de su miRNome según la **Fig. Suplementaria S1**. Además el análisis mediante DESeq2 identificó 50 miRNAs SDE según la **Fig. 18** de los cuales 29 estaban sobreexpresados y 21 subexpresados. Los miRNAs más sobreexpresados en estos pacientes fueron miR-658 y miR-4800-5p que mostraron valores de log2 FC de 3,54 y 3,10 respectivamente. Por el contrario miR-5192 fue el miRNA más subexpresado con un log2 FC de -22,67. La lista completa de los miRNAs SDE se presenta en la **Tabla Suplementaria S11** y el heatmap de los genes SDE se muestra en la **Fig. 19**.

En el análisis de dianas más probables que presentan los miRNAs SDE en EVs derivados del plasma se identificó 44 rutas biológicas KEGG y 1354 procesos biológicos GO. Las 10 rutas principales se representan en las **Fig. 20 y Fig. 21**. Los procesos biológicos GO más relevantes en las vesículas extracelulares de los casos de COVID-19 fueron la biogénesis de componentes celulares, la adhesión celular, el desensamblaje de componentes celulares y el proceso viral. Las rutas más relevantes para los genes diana de los miRNAs mostraron un enriquecimiento en las rutas de señalización MAPK, ErbB, receptor de células T neurotrofinas y adhesión focal.

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes con COVID-19 vs control

	COVID-19	Controles	p-valor
Número de pacientes	36	33	
Edad, años, mediana (IQR)	73,69 (18,80)	65,01 (14,56)	0,008
Sexo: masculino, n (%)	21 (58,3)	21 (63,6)	0,652
Comorbilidades, [n (%)]			
Tabaquismo	2 (5,6)	5 (15,5)	0,187
Alcoholismo	1 (2,8)	2 (6,1)	0,504
Cardiopatía	9 (25,0)	7 (21,2)	0,710
Diabetes	8 (22,2)	4 (12,1)	0,269
Hipertensión arterial	22 (61,1)	16 (48,5)	0,292
Obesidad	7 (19,4)	2 (6,1)	0,099
EPOC	5 (13,9)	3 (9,1)	0,534
Asma	1 (2,8)	1 (3,0)	0,950
Enfermedad renal crónica	0 (0,0)	3 (9,1)	0,064
Bioquímica, [mediana (IQR)]			
Creatinina (mg/dL)	0,85 (0,43)	0,65 (0,40)	0,060
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	8,03 (3,23)	7,23 (1,82)	0,465
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	1,20 (0,87)	2,32 (1,04)	<0,001
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	6,43 (3,21)	4,02 (1,62)	<0,001
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	229,03 (109,93)	241,41 (60,38)	0,267
Triglicéridos (mg/dL)	135,2 (48,1)	106,5 (48,9)	0,018
Colesterol (mg/dL)	135,8 (37,9)	173,1 (30,8)	<,001
Glucosa (mg/dL)	128,8 (60,2)	101,9 (15,3)	0,272
Creatinina (mg/dL)	1,21 (1,01)	1,00 (0,60)	0,633
Bilirrubina (mg/dL)	0,60 (0,50)	0,60 (0,30)	0,751
Medidores hospitalarios			
Temperatura, °C, mediana (IQR)	36,71 (0,81)	36,67 (0,75)	0,953
Éxitus, n (%)	12 (33,3)	0 (0,0)	<0,001
Estancia hospitalaria, días, mediana (IQR)	9,5 (18,0)	0,0 (0,0)	<0,001
Tratamiento, [n (%)]			
Hormonas tiroideas	0 (0,0)	4 (12,1)	0,031
Estatinas	7 (19,4)	11 (33,3)	0,189
β-bloqueantes	1 (2,8)	2 (6,1)	0,504
Inmunosupresores	1 (2,8)	0 (0,0)	0,338

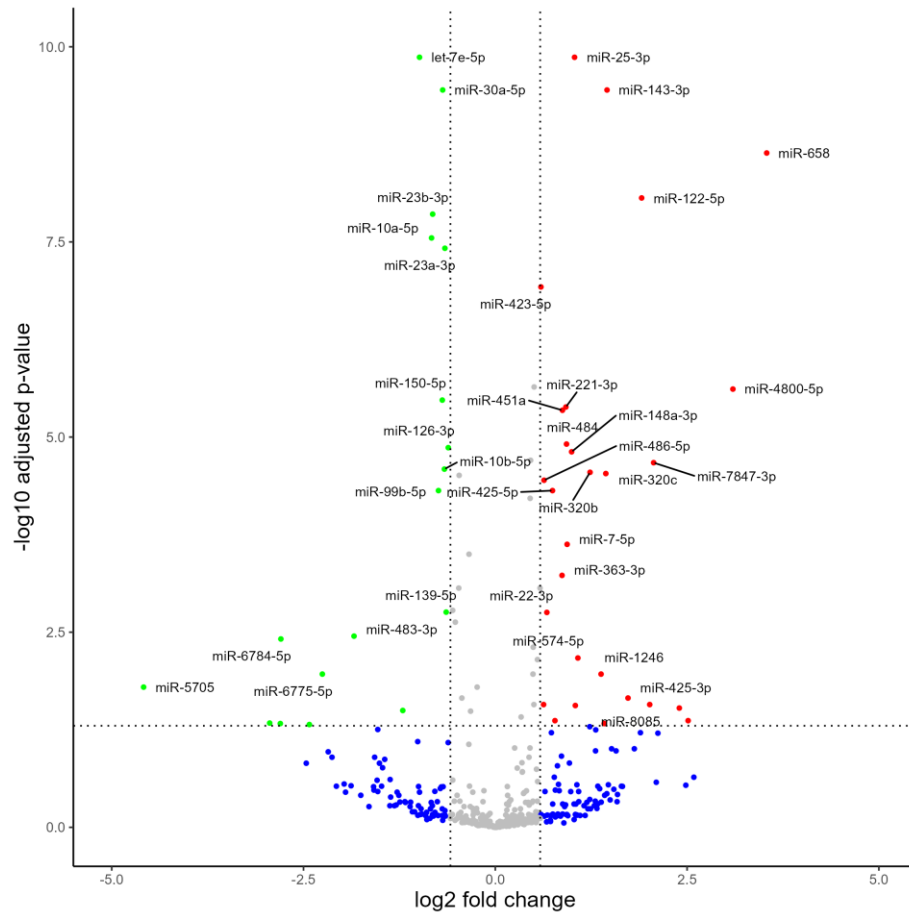


Figura 18: Volcano plot de los miRNAs SDE entre pacientes con COVID-19 y controles en exosomas. las líneas verticales discontinuas indican el valor umbral para un cambio de expresión absoluto ≥ 1.5 , y la línea horizontal discontinua indica el valor umbral para el p -valor ajustado por tasa de descubrimiento falso ≤ 0.05 . Los puntos grises representan los miRNAs que están por debajo del umbral, mientras que los puntos rojos y verdes indican los miRNAs que superan el umbral. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

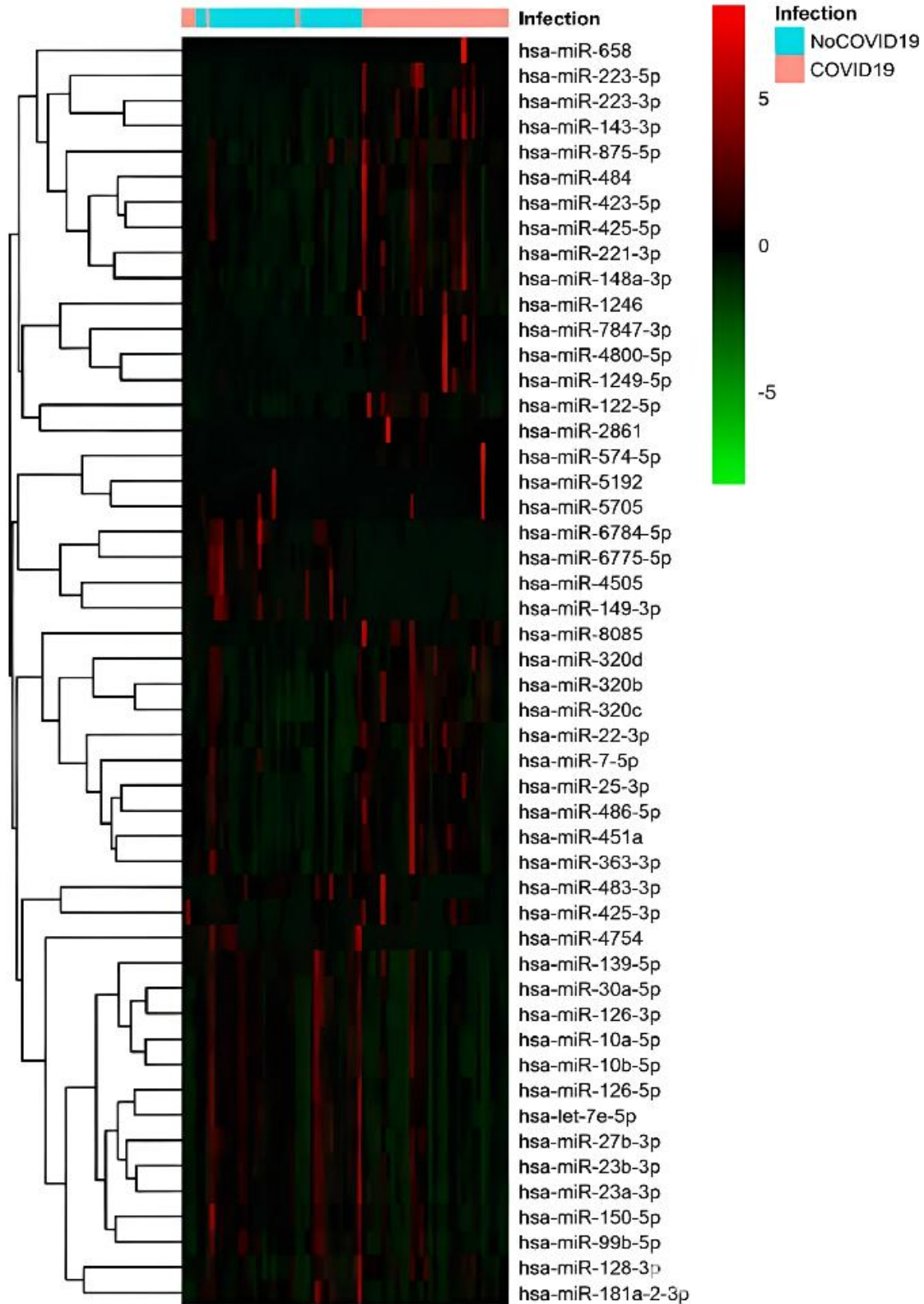


Figura 19: Heatmap de los miRNAs SDE entre pacientes con COVID-19 y controles en exosomas. los participantes del estudio están representados en columnas y los miRNAs SDE en filas, con dendrogramas de agrupamiento a la izquierda para los miRNAs y en la parte superior para las muestras. La escala de color muestra el nivel de expresión relativa de los miRNAs SDE. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

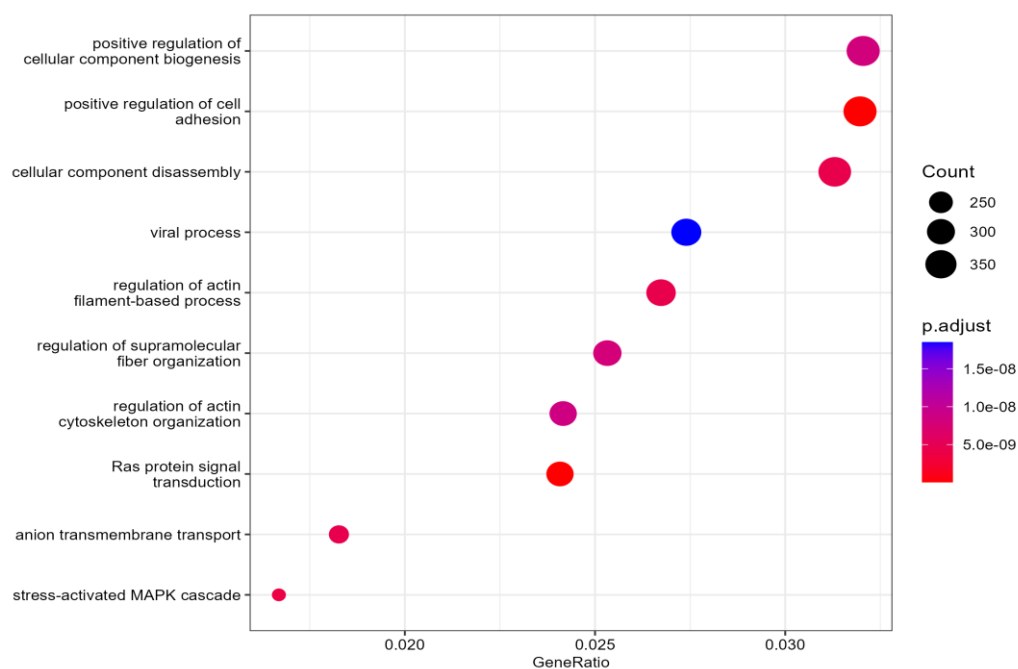


Figura 20: Análisis de enriquecimiento de ontología génica de los miRNAs SDE encontrados en exosomas. Los puntos representan el número de genes asociados a cada ruta o proceso celular, y el color depende del p valor. El p valor para el análisis se establecieron en 0.05. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

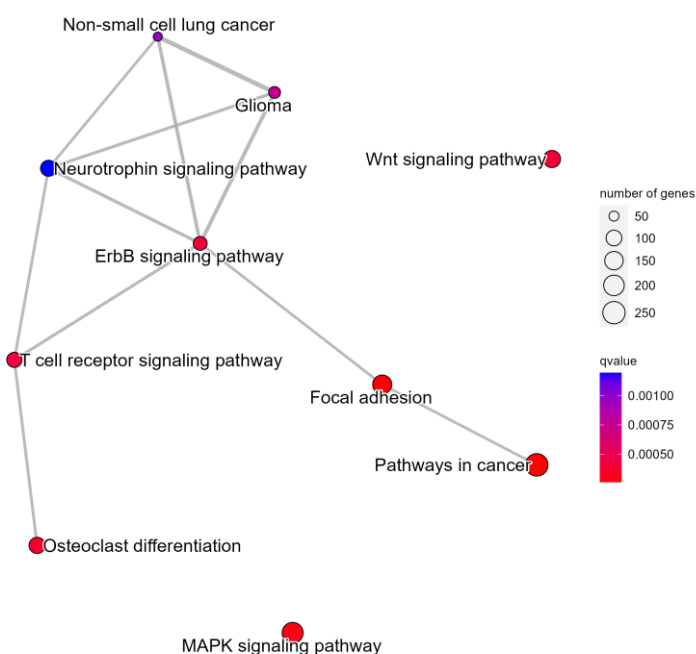


Figura 21: Análisis de enriquecimiento de rutas moleculares KEGG para los miRNAs SDE. Los puntos representan el número de genes asociados a cada ruta o proceso celular, y el color depende del q valor. El q valor para el análisis se establecieron en 0.05. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

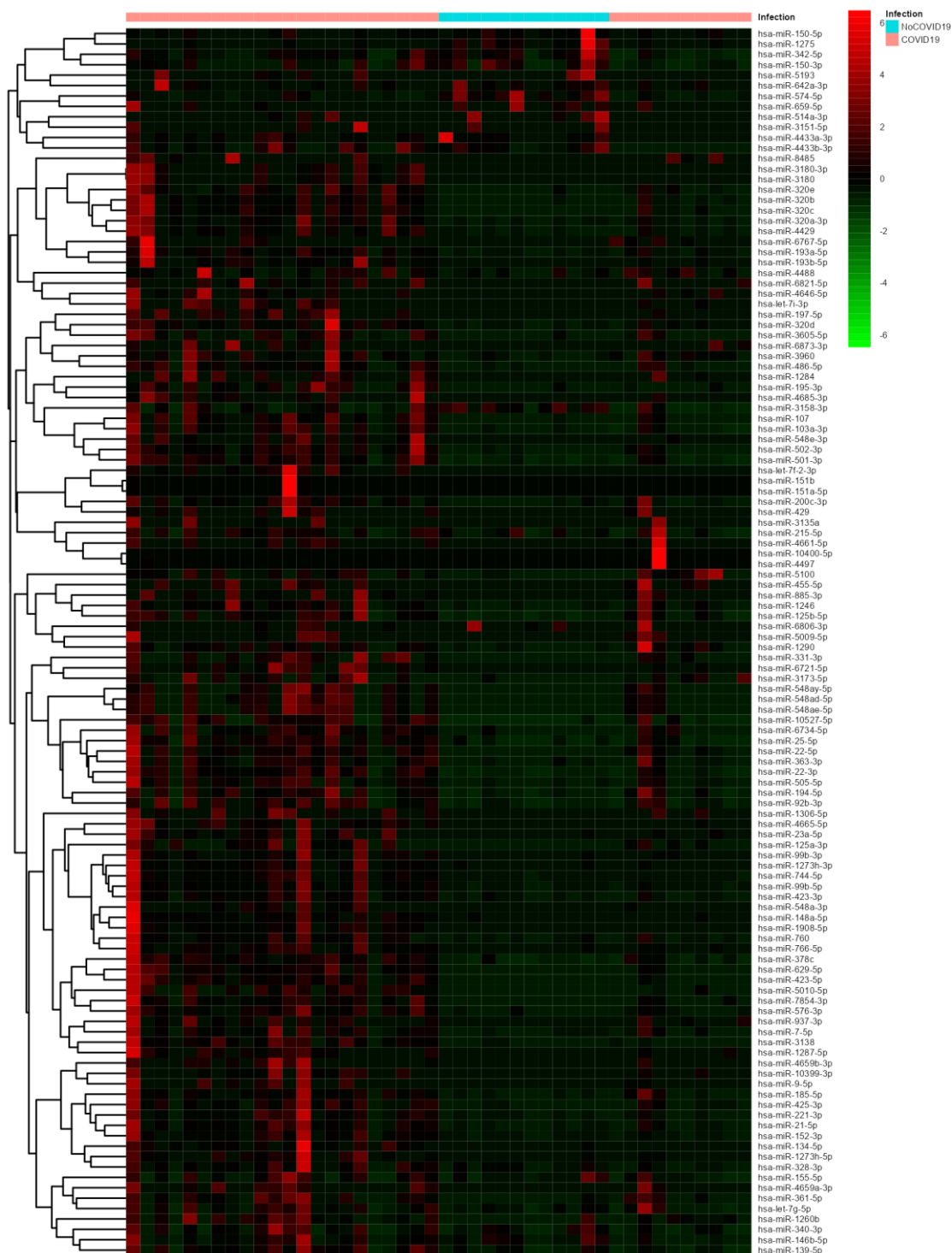


Figura 23: Heatmap de los miRNAs SDE entre pacientes con COVID-19 y controles sanos en plasma. Los participantes del estudio están representados en columnas y los miRNAs SDE en filas, con dendrogramas de agrupamiento a la izquierda para los miRNAs y en la parte superior para las muestras. La escala de color muestra el nivel de expresión relativa de los miRNAs SDE. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

Los valores de los miRNAs SDE en plasma se muestran en la **Tabla Suplementaria S12**, y el heatmap de los genes SDE se presenta en la **Fig. 23**. El análisis funcional de los miRNAs SDE en plasma reportó 1354 procesos celulares según GO y 44 rutas biológicas

KEGG. Las 10 principales rutas se muestran en las **Fig. 24 y Fig. 25**. Los procesos celulares GO más señalados para los miRNAs plasmáticos fueron la biogénesis de componentes celulares, la adhesión celular y la modificación de histonas. Las rutas más relevantes para los genes diana de los miRNAs mostraron asociación en las rutas de señalización de MAPK, ErbB, receptores de células T, neurotrofinas y adhesión focal.

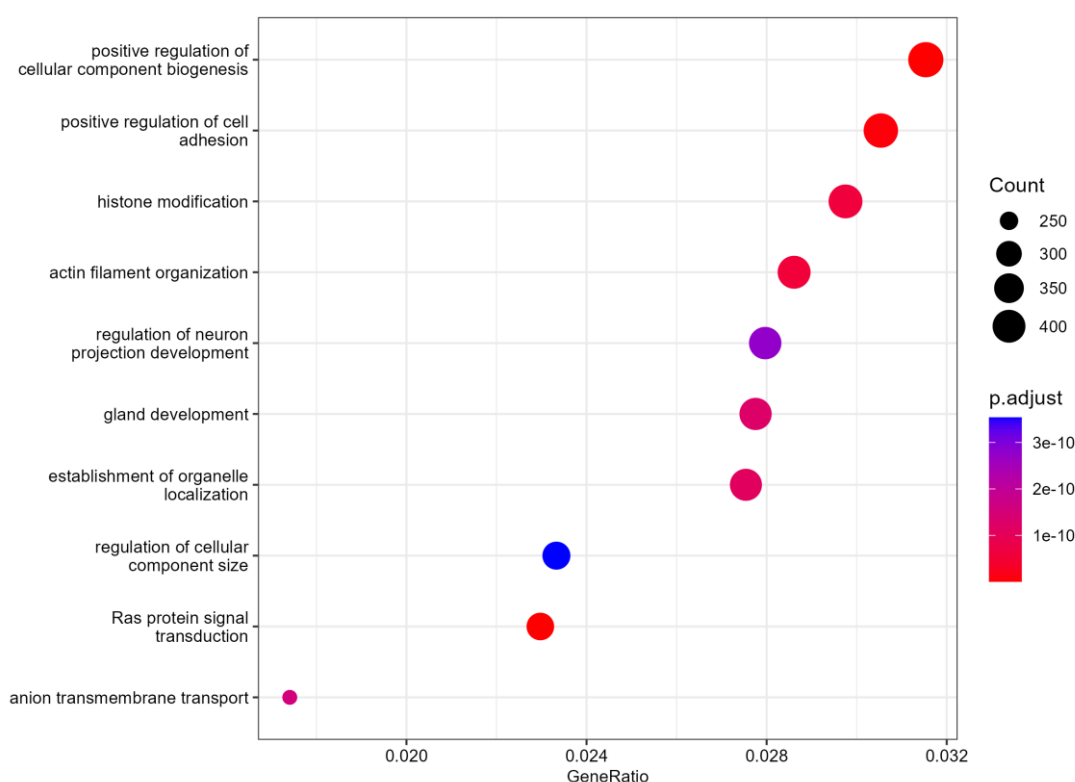


Figura 24: Análisis de enriquecimiento de ontología genética de los miRNAs SDE identificados en plasma. Los puntos representan el número de genes asociados a cada ruta o proceso celular, y el color depende del p valor. El p valor para el análisis se establecieron en 0.05. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

Posteriormente, se determinó los miRNAs SDE comunes entre los provenientes de vesículas extracelulares y libres en plasma. Se encontraron un total de 15 miRNAs SDE en común: miR-7-5p, miR-22-3p, miR-99b-5p, miR-139-5p, miR-150-5p, miR-221-3p, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-363-5p, miR-423-5p, miR-425-3p, miR-486-5p, miR-574-5p y miR-1246 (diagrama de Venn, **Fig. Suplementaria S3**). El análisis funcional de estos 15 miRNAs SDE comunes reportó 21 rutas biológicas KEGG y 545 procesos celulares GO. Los procesos GO más relevantes y asociados para estos miRNAs estuvieron relacionados con procesos catabólicos, como la ubiquitinación, muerte/apoptosis neuronal, y la señalización de la quinasa I- κ B/NF- κ B. Las rutas KEGG estuvieron relacionadas con cáncer, y con las vías de señalización de MAPK, ErbB y mTOR. Las 10 principales rutas se muestran en las **Fig. 27 y Fig. 28**.

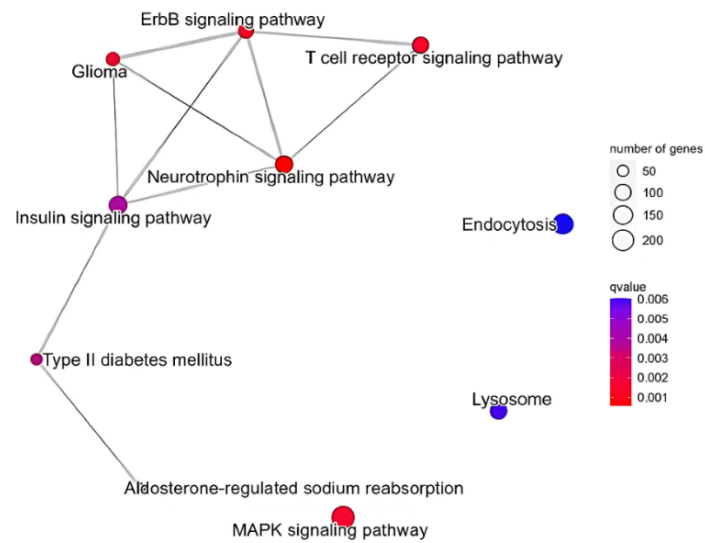


Figura 25: Análisis de enriquecimiento de ontología génica de los miRNAs SDE encontrados en plasma. Los puntos representan el número de genes asociados a cada ruta o proceso celular, y el color depende del p valor. El p valor para el análisis se establecieron en 0.05. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

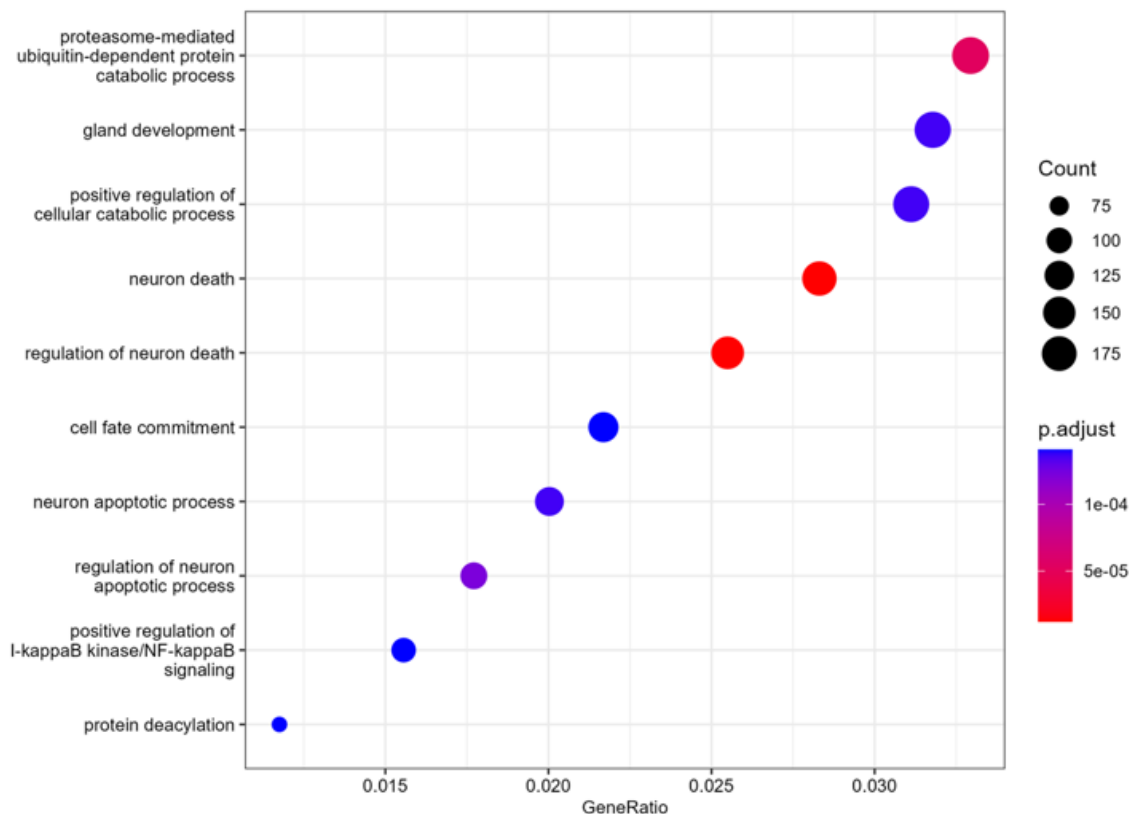


Figura 24: Análisis de enriquecimiento de ontología génica de los miRNAs SDE comunes a EVs y plasma. Los puntos representan el número de genes asociados a cada ruta o proceso celular, y el color depende del p valor. El p valor para el análisis se establecieron en 0.05. SDE: Expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

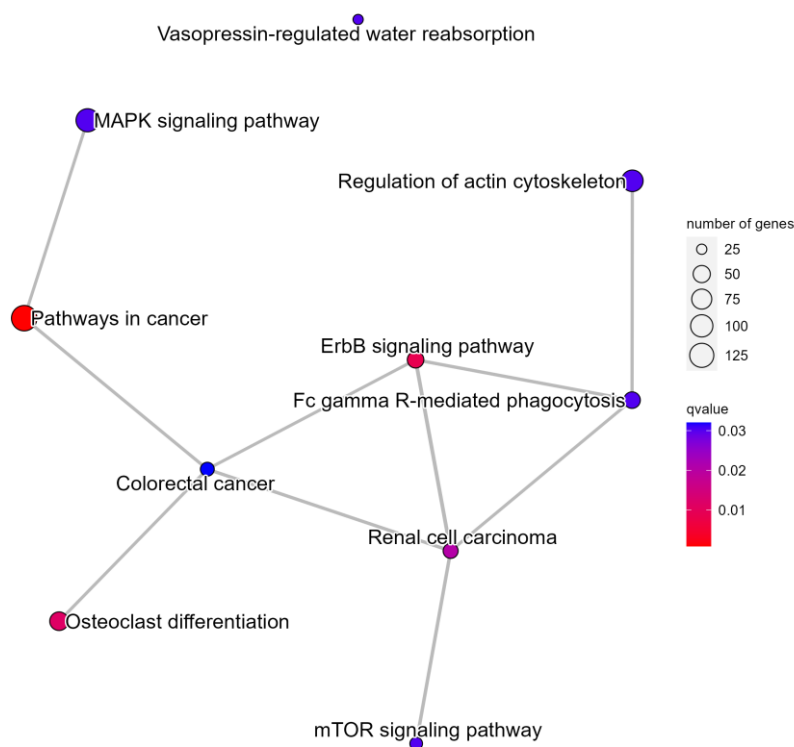


Figura 25: Análisis de enriquecimiento de ontología génica de los miRNAs SDE comunes a EVs y plasma. Los puntos representan el número de genes asociados a cada ruta o proceso celular, y el color depende del p valor. El p valor para el análisis se establecieron en 0.05. EV: vesícula extracelular; SDE: expresado diferencialmente de forma estadísticamente significativa.

3.3. Mortalidad a los 90 días y análisis de supervivencia

Las características de los pacientes según la mortalidad a los 90 días se muestran en la **Tabla Suplementaria S13**. No encontramos diferencias epidemiológicas ni clínicas entre los grupos de pacientes vivos y fallecidos. A continuación, exploramos la capacidad predictiva de los miRNAs derivados EVs en plasma utilizando LASSO Cox, que identificó 10 miRNAs como posibles predictores de mortalidad a los 90 días, ajustados por edad y género (**Fig. Suplementaria 2**): miR-450a-2-3p, miR-4730, miR-6855-5p, miR-6890-5p, miR-199b-5p, miR-18a-3p, miR-6124, miR-1469, miR-3613-5p y miR-320a-3p. De estos, seleccionamos miR-1469 y miR-6124 debido a su mayor poder predictivo, calculado mediante las áreas bajo la curva ROC (>0.85). Todos los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 6**.

Los niveles de expresión de los miRNAs se clasificaron en altos y bajos según su expresión, calculada mediante la función `surv_cutpoint` del paquete R `survminer`. Usando

el estimador de Kaplan-Meier, observamos que los niveles altos de expresión de ambos miRNAs (por encima del umbral calculado para cada uno) se asociaron con una menor probabilidad de supervivencia a los 90 días (representado en las curvas de Kaplan-Meier, **Fig. 26**). El riesgo relativo y la significancia estadística de la variable dicotómica alto/bajo para cada miRNA, así como la edad y el género, se presentan en la **Fig. 27**. Además, evaluamos el poder predictivo de miR-1469 y miR-6124 combinando sus valores de expresión con edad y género, alcanzando un área bajo la curva de 0.938, superior al poder predictivo de los miRNAs individuales, ya sea ajustados o no por género y edad (**Tabla Suplementaria S14**). Ninguno de los miRNAs, ni miR-1469 ni miR-6124, fue diferencialmente expresado en plasma.

Tabla 6. Valores obtenidos tras la regresión de Cox para los miRNAs

	Coefficiente β	HR	p-valor	AUC
miR-4730	3.44	31.10	0.026	0.500
miR-18a-3p	0.24	1.28	0.006	0.660
miR-199b-5p	0.11	1.12	0.010	0.690
miR-450a-2-3p	0.29	1.34	0.018	0.750
miR-6855-5p	0.18	1.19	0.104	0.750
miR-6890-5p	0.74	2.10	0.001	0.750
miR-3613-5p	-0.02	0.98	0.116	0.750
miR-320a-3p	0.01	1.00	0.101	0.810
miR-6124	0.05	1.05	0.004	0.880
miR-1469	0.14	1.15	0.016	0.910

AUC, área bajo la curva; HR, riesgo relativo (hazard ratio).

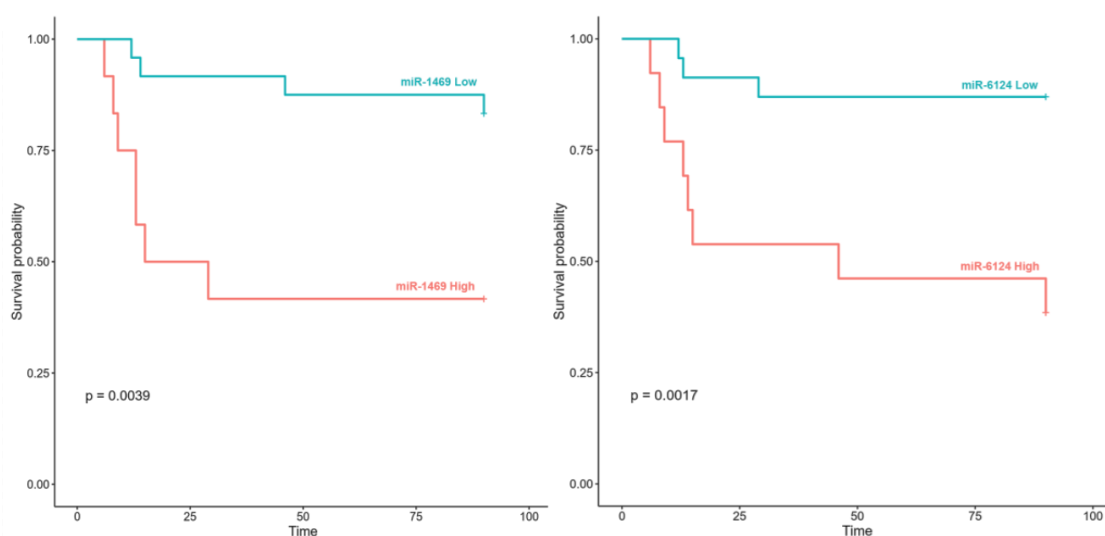


Figura 26: Curvas de Kaplan-Meier para miR-1469 y miR-6124 durante los primeros 90 días desde la admisión y la toma de muestras.

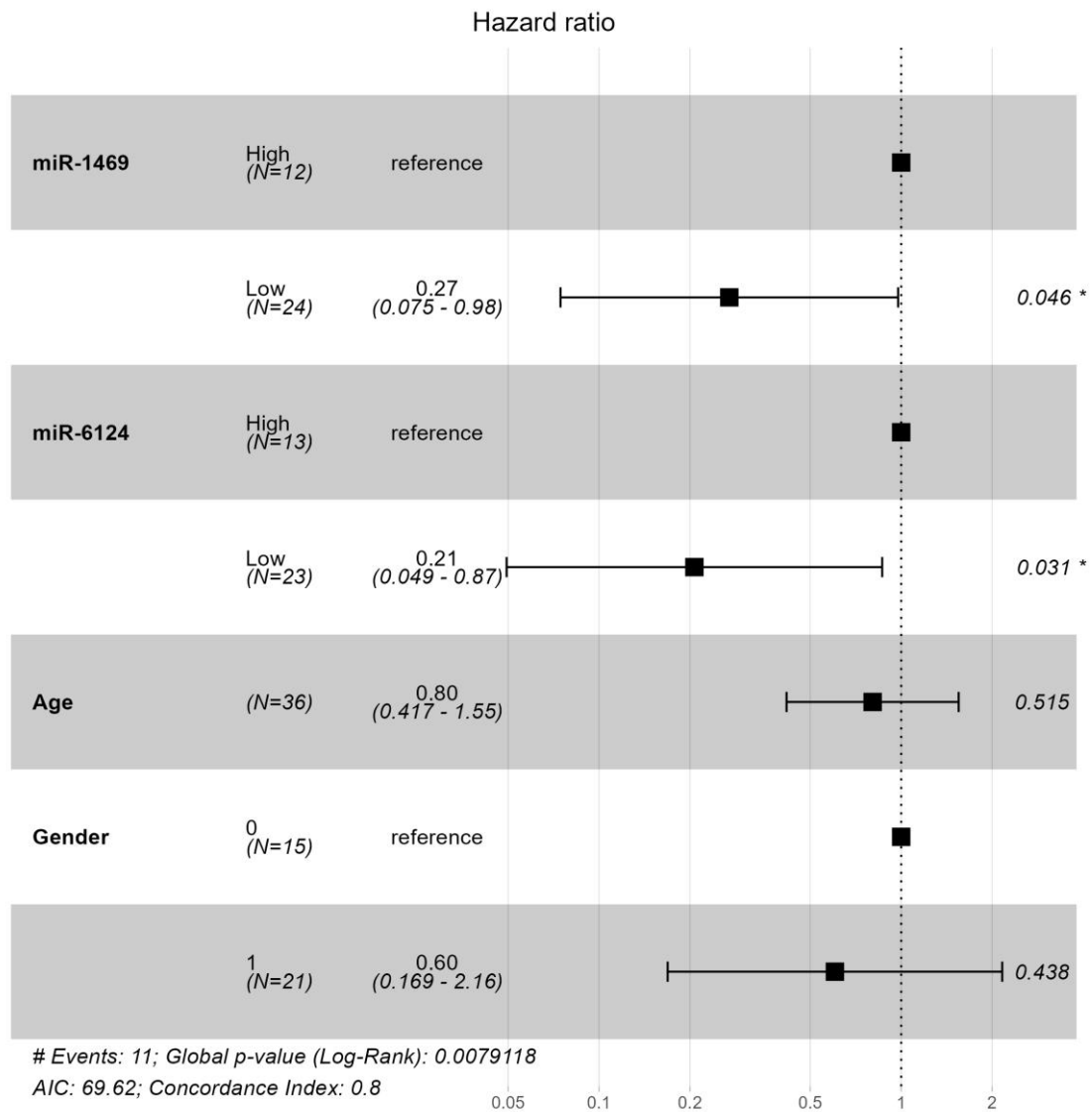


Figura 27: Diagrama de bosque del riesgo relativo resultante del análisis logístico multivariante. Estos resultados muestran el pronóstico de la COVID-19 asociado con los niveles de expresión de ambos miRNAs, cada uno de los cuales se clasifica como alto o bajo de acuerdo con el paquete *survminer* de R.

CAPÍTULO VI: ***DISCUSIÓN***

Los principales hallazgos descritos en esta Tesis Doctoral se centran en la identificación de biomarcadores en plasma de pacientes hospitalizados por COVID-19; con el propósito de ayudar a identificar con precisión los casos de mayor gravedad. En primer lugar, se describe cómo una única citoquina junto al grupo sanguíneo y datos analíticos usados frecuentemente en práctica clínica, pueden predecir con alta sensibilidad y especificidad los pacientes que precisarán de ventilación mecánica invasiva como terapia de soporte. En segundo lugar, se exploró cómo evoluciona el perfil de citoquinas a lo largo de los primeros días de ingreso, señalando a tres grupos de citoquinas importantes tanto en la mortalidad como en la supervivencia, así como los momentos más adecuados para predecir los casos de fatal evolución. Y, en tercer lugar, se analizó otro grupo de biomarcadores relacionados con la producción de citoquinas como son los miRNAs de vesículas extracelulares, que influyen en la respuesta inmune de paciente con peor pronóstico; lo que llevo a identificar procesos clave en la inmunología contra el SARS-CoV-2 y dos miRNAs con una alta capacidad predictora de la mortalidad.

Una de las características relevantes de la COVID-19 es la heterogeneidad respecto a las manifestaciones clínicas entre pacientes, en los que se incluye fiebre moderada, tos, disnea, fatiga, dolores musculares o corporales, y dolor de cabeza, pero también comprende a pacientes críticos que han manifestado una lesión pulmonar aguda (ALI) y eventualmente pueden evolucionar a un síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) altamente letal [218]. Por este motivo, desde el comienzo de la pandemia se estudió con detalle numerosos biomarcadores tradicionalmente empleados en la práctica clínica cuya precisión, detección precoz y orientación terapéutica resultan limitados, lo que ha llevado a describir biomarcadores estrechamente relacionados con la fisiopatología de la COVID-19 [195,219–223].

Las citoquinas desempeñan un papel importante en la inmunopatología de las infecciones virales, incluida la COVID-19. La producción moderada de citoquinas durante la infección por SARS-CoV-2 da lugar a síntomas leves similares a los de la gripe lo que deriva en procesos de reparación para restaurar la función de los tejidos y órganos [224]. Sin embargo, es bien sabido que la infección por SARS-CoV-2 también puede desencadenar una respuesta inflamatoria descontrolada que, en los casos más graves, da lugar a un síndrome de tormenta de citoquinas [60]. Esta respuesta inflamatoria patológica causa daños colaterales en los tejidos y, por lo tanto, un desenlace clínico fatal [225,226]. Gran parte del daño provocado en el tejido pulmonar se debe a un desequilibrio en el

reclutamiento de células inmunitarias, lo cual conlleva una disminución de los linfocitos (linfopenia) y un aumento de los neutrófilos activados [67,227]. Por esta razón, se han publicado estudios relevantes que muestran cómo el índice neutrófilos-linfocitos (NLR), combinada con IgG, podría utilizarse para indicar la gravedad de la COVID-19 [228,229]. De hecho, estudios posteriores se han centrado en el papel de los neutrófilos en el contexto de la hiperinflamación durante la infección por SARS-CoV-2 en los casos más críticos y se ha observado que la citoquina HGF, contenida en los gránulos de los neutrófilos, tiene un valor predictivo importante en la gravedad de la enfermedad [74,230,231]. Los resultados expuestos respaldan la noción de que los niveles de HGF podrían tener un valor predictivo en el riesgo de intubación o fallecimiento en pacientes hospitalizados por COVID-19. Se ha descrito que la infección por SARS-CoV-2 induce una mayor producción de la citoquina factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) que a su vez estimula un aumento en el recuento de neutrófilos en la sangre, los cuales son reclutados hacia los pulmones, donde otras citoquinas los activan para liberar el contenido de sus gránulos, entre los que se incluye HGF [76].

Uno de los aspectos mejor descritos de la COVID-19 ha sido la identificación de los factores de riesgo que afectan a la susceptibilidad y progresión de la enfermedad. Se han establecido una serie de condiciones clínicas comunes (por ejemplo, hipertensión, diabetes y enfermedades cardiovasculares y respiratorias crónicas) y sociodemográficos (por ejemplo, sexo, edad y raza/etnia) que son relevantes a la hora de considerar si un paciente tiene probabilidad de evolucionar desfavorablemente [232]. Adicionalmente, la COVID-19 presenta una relación con el grupo sanguíneo ABO, tal como ocurre en ciertas enfermedades infecciosas, respecto a la susceptibilidad y progresión de la enfermedad [131,137]. La evidencia sugiere que el grupo sanguíneo ABO desempeña un papel en la inmunopatogénesis de la infección por SARS-CoV-2, siendo el grupo O protector y el grupo A asociado a un mayor riesgo de susceptibilidad y gravedad de la enfermedad [233]. Posiblemente, las diferencias en la expresión de los antígenos del grupo sanguíneo puedan aumentar o disminuir la sensibilidad del huésped a la infección por patógenos, lo que podría explicar parcialmente la diferencia en la predisposición del huésped a la COVID-19 según el grupo sanguíneo [234]. Sin embargo, otra posible explicación contempla la capacidad de los anticuerpos anti-A para inhibir la interacción entre la proteína S y el receptor ACE2, proporcionando así protección [137].

Los datos analíticos en el modelo predictivo hacen que el modelo sea factible durante la práctica clínica rutinaria y combina la evaluación de los casos de COVID-19 con peor pronóstico junto a predictores específicos de la inmunidad asociados al SARS-CoV-2, para identificar aquellos casos que precisen ventilación mecánica invasiva. Está establecido que la gravedad de la enfermedad se asocia con niveles elevado de PCR, PCT, dímero D o ferritina [235]. De hecho, se han propuesto para la práctica clínica modelos predictivos validados basados en regresiones logísticas univariantes con el propósito de detallar un criterio en los casos de síndrome de tormenta de citoquinas asociada a la COVID-19 [236,237]. Sin embargo, este estudio amplía la perspectiva mediante un análisis multivariante que incluyo el perfil de citoquinas, los datos analíticos y factores de riesgo y susceptibilidad. Además, este estudio concuerda con los datos disponibles y proporciona valores de corte que contribuyen a obtener un modelo con una alta sensibilidad y especificidad.

Numerosos estudios han analizado el papel de las citoquinas respecto a variables de estudio relacionadas con la severidad y mortalidad de pacientes COVID-19, de manera similar a lo expuesto anteriormente [238–240]. No obstante, existe un menor número de estudios que exploran los cambios que ocurren durante la hospitalización de pacientes fallecidos por COVID-19 [241,242]. Al respecto de esto, el análisis del perfil de citoquinas durante los primeros seis días de ingreso señala a tres combinaciones de citoquinas como responsables de la mortalidad en pacientes COVID-19 y, por lo tanto, sugieren tres posibles vías terapéuticas independientes.

La combinación conformada por IL-1 α y VEGFA muestra niveles elevados durante el día de ingreso y se mantiene constante en los posteriores días. La importancia de este conjunto puede explicarse por su implicación en la respuesta inicial a la infección severa por COVID-19. Estudios iniciales revelaron niveles más altos de IL-1 α , que es una citoquina característica de las primeras etapas de la respuesta inmune innata [243]. De hecho, se ha descrito a la IL-1 α como un marcador temprano para predecir un mal desenlace clínico en pacientes graves de COVID-19 [244]. Esto podría explicarse por el hecho de que el precursor de IL-1 α , a diferencia de IL-1 β o IL-1RA no necesita activarse y puede desencadenar una fuerte respuesta inflamatoria al ser liberada por células dañadas [245]. Por otro lado, VEGFA desempeña un papel clave en el desarrollo pulmonar y en la organización de la red vascular pulmonar [246]. VEGFA puede ser liberado durante la hipoxia y en situaciones inflamatorias donde hay daño al endotelio. Su efecto es mediado

por VEGFR-1 y VEGFR-2, los cuales contribuyen a la hematopoyesis, quimiotaxis de monocitos y aumento de la permeabilidad. El componente PC3 podría interpretarse como la expresión inicial del daño celular severo en los pulmones por infiltración de macrófagos inducida en respuesta a la infección, lo que iniciaría la patogénesis fatal y exacerbaría la respuesta inmune observada en etapas posteriores [247]. De hecho, nuestros resultados apoyan estudios previos que prueban que el uso temprano en enfermedad grave de antagonistas de IL-1, como Anakinra, mejora el pronóstico al bloquear la progresión de la tormenta de citoquinas [248].

La siguiente combinación de citoquinas en los que se incluye a HGF, SCF, IL-18, MCP-1 y eotaxina también se encuentra incrementada en el grupo de pacientes COVID-19 fallecidos, sin embargo, a diferencia de IL-1 α y VEGFA, la tendencia durante los primeros seis días de hospitalización es creciente; siendo especialmente elevados al sexto día. Dicha combinación podría correlacionar con daño pulmonar severo irreversible, debido tanto a la propia infección virus como a una respuesta inmune descontrolada. IL-18, una citoquina de la familia IL-1 involucrada en la respuesta inmune celular, se secreta tras la activación de macrófagos en infecciones virales y se asocia con daño endotelial en el tejido pulmonar [245]. En pacientes graves con COVID-19 se ha demostrado un desequilibrio entre IL-18 y su inhibidor IL-18BP; de hecho se ha propuesto el uso de un anticuerpo contra IL-1R7 para reducir la señalización inflamatoria mediada por IL-18 en estos pacientes [249–251]. SCF, HGF y eotaxina son estimuladas por procesos inflamatorios y secretadas por granulocitos tras estimulación con IL-18, y todas se han relacionado con daño pulmonar severo en otras infecciones virales [252–254]. Finalmente, MCP-1 ha sido descrito como un factor pronóstico en COVID-19 por su implicación en el reclutamiento de monocitos y además ha sido relacionado, junto a elevados niveles de dímero D, con procesos de inmutrombosis que es responsable de más del 70% de fallecidos por COVID-19 [255–257]. Por lo tanto, PC2 conforma una vía terapéutica basada en limitar el daño pulmonar que deriva en casos de ARDS potencialmente letales.

Por último, IL-2, IL-15 y BDNF constituye un conjunto de citoquinas que actúa como factor protector para la supervivencia y, por lo tanto, se encuentra disminuido en los pacientes con un fatal desenlace clínico. BDNF es clave en la neuroplasticidad, la cual se ve afectada por estados inflamatorios, y los niveles bajos de BDNF se han asociado con COVID-19 severo [258,259]. IL-2 e IL-15 estimulan la proliferación de

linfocitos T, la secreción de inmunoglobulinas y la generación de células NK [260]. IL-15 desempeña un papel esencial en la eliminación viral mediante respuestas T de alta avidez y persistencia de células de memoria [261]. Por su parte, IL-2 está involucrado en la activación de linfocitos T [260]. Ambas citoquinas también pueden regular la proliferación celular y Evitar respuestas excesivas [243]. La disminución progresiva de BDNF, IL-15 e IL-2 podría ser un signo de deterioro. Por ello, estos datos sugieren que dicho grupo de citoquinas constituye una vía terapéutica dirigida a modular la respuesta inmune intensificando la acción de IL-2, IL-15 y BDNF [262].

Los resultados expuestos ponen de manifiesto la relevancia de las citoquinas en la prognosis de pacientes COVID-19 con una evolución desfavorable. Sin embargo, las investigaciones actuales señalan la relación de los miRNA con las citoquinas y los señalan como un grupo de biomarcadores emergentes en la prognosis de la COVID-19 [219]. De hecho los miRNAs tienen un papel clave en la modulación de la respuesta inmune, ya que se ha caracterizado de qué forma las alteraciones en el perfil de miRNA ejercen efectos cruciales en la patogénesis de infecciones virales [263–266]. En el caso del SARS-CoV-2, se observa un papel inmunomodulador de los miRNAs procedentes de las vesículas extracelulares (EVs) sobre las células que expresan ACE2, lo que puede afectar tanto a la producción de mediadores inflamatorios, como a sus receptores y rutas de señalización asociadas, entre las que se incluye la respuesta mediada por IFN de tipo I, que se encuentra afectada en los casos severos de COVID-19 [267,268]. En los resultados expuestos se evidencia que la infección por SARS-CoV-2 altera el perfil de miRNAs procedentes EVs derivadas del plasma de pacientes con COVID-19 severo; revelando un conjunto de miRNAs SDE, entre los cuales un subconjunto también se encontraba presentes en el plasma de una cohorte con COVID-19 severo. Adicionalmente, la combinación de los niveles de expresión de miRNAs en EVs derivadas del plasma de miR-1469 y miR-6124, ajustados por edad y sexo son capaces de predecir un desenlace fatal con una similar precisión al perfil de citoquinas.

La caracterización del miRNoma en EVs derivadas del plasma de pacientes con COVID-19 grave mostró 50 miRNAs SDE con respecto a los controles. Específicamente, miR-658, miR-4800-5p y miR-1249-5p fueron los miRNAs más sobreexpresados, con un cambio de expresión superior a 24 veces en comparación con los controles. miR-658 está sobreexpresado en diversas enfermedades y regula positivamente el factor de crecimiento de hepatocitos (MET) en el cáncer de pulmón [269]. Otros miRNAs sobreexpresados se

han relacionado con otras infecciones virales, como miR-4800-5p y miR-1249-5p. miR-4800-5p está sobreexpresado en plasma de pacientes con fibrosis hepática después de infección por hepatitis B [270] y en neumonía secundaria asociada a sepsis [271], además de asociarse a disfunción orgánica causada por la gripe A [272]. Por el contrario, miR-5192 presenta una menor expresión que se ha vinculado con la fibrosis pulmonar idiopática y asma [273,274]. Los cambios marcados observados en estos miRNAs merecen estudio adicional, pues su papel específico en infecciones virales es aún desconocido.

Las dianas de los miRNAs SDE en EVs derivadas del plasma de pacientes con COVID-19 severo están involucrados en procesos inmunes que favorecen relacionados la adhesión celular y la biogénesis de componentes celulares. Se ha propuesto que los virus secuestran la maquinaria celular exosomal, y que las moléculas de adhesión en la superficie de los exosomas tienen un papel clave en su destino funcional, facilitando la captación celular, el microambiente y la interacción célula-célula, además del reconocimiento inmune [275]. De hecho, han vinculado niveles plasmáticos de moléculas de adhesión celular con la gravedad de COVID-19 [276]. Asimismo, los cuerpos apoptóticos inducidos por el efecto citopático del SARS-CoV-2 ha sido descrito como componente clave en la desregulación de moléculas proinflamatorias en casos severos de COVID-19 [277]. De forma concordante, las vías biológicas más relevantes alteradas en estos pacientes incluyeron adhesión focal y enriquecimiento en las vías MAPK, ErbB, neurotrofina y receptor de células T. Estas vías, interrelacionadas, regulan la proliferación, migración, diferenciación, inflamación y supervivencia celular, y pueden activarse por citoquinas típicamente elevadas en infección por SARS-CoV-2 o señales de estrés como la hipoxia [278].

Los miRNAs derivados de EVs plasmáticas son más estables y fiables como biomarcadores, ya que están protegidos de la degradación por RNasas endógenas por su membrana lipídica y además en plasma se encuentran más diluidos lo que dificulta su identificación en cuando a si están diferencialmente expresados de manera significativa [279]. Aunque también existen miRNAs libres en plasma, pocos estudios comparan ambos compartimentos. En personas sanas, se ha observado una similitud en los perfiles de miRNAs entre ambos, pero otros estudios en pacientes con cáncer han mostrado diferencias en potencial diagnóstico entre miRNAs plasmáticos y aquellos en EVs [280,281]. Por este motivo en los resultados se compara ambos tipos de miRNAs entre

pacientes con COVID-19 severo y controles lo que llevo a identificar 15 miRNAs SDE comunes entre los 50 SDE en EVs plasmáticas y los 115 SDE en plasma. Entre ellos, 11 estaban sobreexpresados, 2 subexpresados y 2 mostraban regulación discordante. Uno de estos últimos fue miR-574-5p (sobreexpresado en EVs y subexpresado en plasma), que ha sido previamente identificado en modelos murinos asociado al síndrome de distrés respiratorio agudo y regulador de ACE2 en hombres con COVID-19 [282,283]. En cambio, miR-99b-5p estaba subexpresado en EVs y sobreexpresado en plasma, y se ha asociado a la respuesta inmune en infecciones por *Mycobacterium* [284]. Muchos miRNAs sobreexpresados en EVs y plasma se han asociado previamente con la desregulación inflamatoria y la gravedad en COVID-19: el miR-320, miR-7-5p, miR-486-5p y miR-221-3p han sido relacionados con inflamación y daño tisular [285–288]. miR-1246 también es un regulador de ACE2 y biomarcador en sepsis relacionada con neumonía [285,286,289]. miR-221-3p participa en la escisión de ACE2 mediada por ADAM17 que está implicado en daño endotelial y coagulopatía pulmonar en COVID-19 [287,288]. La sobreexpresión de miR-423-5p y miR-221-3p también se ha vinculado con insuficiencia cardíaca y miocarditis viral y ha sido propuesto como biomarcador de infección por SARS-CoV-2 y predictor de mortalidad [217,290–292]. Por otra parte, se ha identificado dos miRNAs subexpresados tanto en EVs como en plasma: miR-150-5p y miR-139-5p. El primero inhibe la proteína viral Nsp10, cuya desregulación podría promover replicación viral y gravedad, desarrollo de linfocitos B y células NK, y asociarse a estancias prolongadas en UCI en COVID-19 [293–296] miR-139-5p regula negativamente al receptor CXCR4, clave en respuestas inmunes innatas y adaptativas, cuyo ligando, CXCL12, se encuentra altamente expresado en tejidos inflamados lo que exacerba la respuesta inflamatoria en casos severos de COVID-19 [297,298].

El análisis funcional de las principales dianas de los 15 miRNAs SDE comunes entre vesículas extracelulares y plasma sugiere una participación relevante en procesos como la ubiquitinación y muerte neuronal. La ubiquitinación es clave en la respuesta inmune al SARS-CoV-2, induciendo defensas antivirales y favoreciendo la replicación viral [299]. La muerte neuronal se ha asociado a neuroinflamación glial secundaria a estrés oxidativo en COVID-19 [300]. Dado que todas las células generan EVs, su análisis puede proporcionar una visión integral del estado molecular del organismo. Las vías KEGG más relevantes incluían MAPK y vías relacionadas con el cáncer, implicadas en gravedad y disfunción inmune en COVID-19 [301]. Por lo tanto, los miRNAs muestran

procesos clave relacionados con la mortalidad de la COVID-19 y de hecho miR-1469 y miR-6124 en EVs derivadas de plasma son capaces de predecir mortalidad a los 28 días. [302]. Es importante señalar que estos miRNAs no se detectaron en plasma, lo que puede deberse a la distinta distribución de miRNAs entre sus fuentes, de modo que los miRNAs plasmáticos derivan principalmente de células sanguíneas, mientras que las EVs varían según el estado y origen celular. El miR-1469 se ha relacionado con varios tipos de cáncer y apoptosis celular, mientras que miR-6124 ha sido propuesto como biomarcador de ictus y cáncer pulmonar [303–305]. Su combinación podría servir como predictor temprano de riesgo de mortalidad para guiar el tratamiento durante el ingreso en UCI.

En atención a todo lo anterior, los biomarcadores relativos a la inmunopatología de la COVID-19 muestran resultados prometedores que ayudan a reducir la variabilidad en el momento de identificar a los pacientes con un pronóstico desfavorable, así como aportar nuevas vías terapéuticas prometedoras. Sin embargo, las principales limitaciones de los resultados expuestos y analizados en esta Tesis Doctoral tienen que ver con que son estudios unicéntricos, con un tamaño muestral adecuado pero limitado, sin validación en una nueva cohorte y la ausencia de pruebas experimentales que describan con precisión los mecanismos moleculares subyacentes que han sido referenciados en otros estudios.

CAPÍTULO VII: ***CONCLUSIONES***

- I. HFG constituye un biomarcador importante a la hora de predecir mortalidad y severidad teniendo en cuenta la glucemia, dímero D, procalcitonina, ferritina y grupo sanguíneo.
- II. Los pacientes COVID-19 que remitieron muestran niveles elevados de BDNF, IL-12 e IL-15 relacionado con una respuesta eficaz por parte de linfocitos T y células NK.
- III. Las citoquinas HGF, MCP-1, IL-18, eotaxina y SCF presenta una tendencia creciente en los pacientes de COVID-19 fallecidos durante su ingreso, mientras que IL-1 α y VEGFA se mantiene constante en los primeros días de ingreso.
- IV. La expresión diferencial de miRNAs asociados con la mortalidad en pacientes COVID-19, está relacionado con vías de señalización inflamatorias y mediadores en la adhesión celular durante el reclutamiento de leucocitos.
- V. Los miRNAs miR-1469 y miR-6124 están diferencialmente expresados en los casos severos y son capaces de predecir con alta precisión la mortalidad en los pacientes hospitalizados por COVID-19.

CAPÍTULO VIII:
BIBLIOGRAFÍA

1. Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* (London, England). 2020;395:497–506; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
2. WHO. Novel coronavirus – China. Jan 12, 2020. <http://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>.
3. Burki T. First shared SARS-CoV-2 genome: GISAID vs virological.org. *The Lancet Microbe*. 2023;4:e395; [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00133-7)
4. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020-<https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.
5. WHO Situation Report on 11 February 2020- https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf?sfvrsn=fb6d49b1_2.
6. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5:536–44; <https://doi.org/10.1038/S41564-020-0695-Z>
7. Anderson EL, Turnham P, Griffin JR, Clarke CC. Consideration of the Aerosol Transmission for COVID-19 and Public Health. *Risk Anal*. 2020;40:902–7; <https://doi.org/10.1111/RISA.13500>
8. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*. 2020;25:1; <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
9. Wang C, Horby PW, Hayden FG, Gao GF. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet* (London, England). 2020;395:470–3; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30185-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30185-9)
10. Using face masks in the community Reducing COVID-19 transmission from potentially asymptomatic or pre-symptomatic people through the use of face masks 8 April 2020 - [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/2020-04/face-masks-in-the-community-reducing-covid-19-transmission-from-potentially-asymptomatic-or-pre-symptomatic-people-through-the-use-of-face-masks-8-april-2020.pdf](https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/2020-04/face-masks-in-the-community-reducing-covid-19-transmission-from-potentially-asymptomatic-or-pre-symptomatic-people-through-the-use-of-face-masks-8-april-2020.pdf)

11. Recomendaciones sobre el uso de mascarillas en el contexto de la COVID-19 Orientaciones provisionales 6 de abril de 2020. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331789/WHO-2019-nCoV_IPC_Masks-2020.3spa.pdf;sequence=1&isAllowed=y.
12. CDC Museum COVID-19 Timeline - <https://www.cdc.gov/museum/timeline/covid19.html>.
13. Haileamlak A. The impact of COVID-19 on health and health systems. *Ethiop J Health Sci.* 2021;31:1073–4; <https://doi.org/10.4314/ejhs.v31i6.1>
14. Grein J, Ohmagari N, Shin D, et al. Compassionate Use of Remdesivir for Patients with Severe Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;382:2327–36; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2007016>
15. Mitjà O, Corbacho-Monné M, Ubals M, et al. Hydroxychloroquine for Early Treatment of Adults With Mild Coronavirus Disease 2019: A Randomized, Controlled Trial. *Clin Infect Dis.* 2021;73:E4073–81; <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA1009>
16. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383:2603–15; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2034577>
17. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, et al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384:403–16; <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
18. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet (London, England).* 2021;397:99–111; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
19. Mak GC, Cheng PK, Lau SS, et al. Evaluation of rapid antigen test for detection of SARS-CoV-2 virus. *J Clin Virol.* 2020;129; <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2020.104500>
20. Tillett RL, Sevinsky JR, Hartley PD, et al. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. *Lancet Infect Dis.* 2021;21:52–8; [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30764-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30764-7)

21. Yasir M, Lankala CR, Kalyankar P, et al. An Updated Systematic Review on Remdesivir's Safety and Efficacy in Patients Afflicted With COVID-19. *Cureus*. 2023;15:e43060; <https://doi.org/10.7759/CUREUS.43060>
22. WHO chief declares end to COVID-19 as a global health emergency - <https://news.un.org/en/story/2023/05/1136367>.
23. Park HJ, Gonsalves GS, Tan ST, et al. Comparing frequency of booster vaccination to prevent severe COVID-19 by risk group in the United States. *Nat Commun*. 2024;15:1883; <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45549-9>
24. Feikin DR, Higdon MM, Abu-Raddad LJ, et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: results of a systematic review and meta-regression. *Lancet* (London, England). 2022;399:924–44; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00152-0)
25. Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res*. 2006;117:17–37; <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.01.017>
26. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annu Rev Virol*. 2016;3:237–61; <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
27. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5:536–44; <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
28. Chaillon A, Smith DM. Phylogenetic Analyses of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) B.1.1.7 Lineage Suggest a Single Origin Followed by Multiple Exportation Events Versus Convergent Evolution. *Clin Infect Dis*. 2021;73:2314–7; <https://doi.org/10.1093/cid/ciab265>
29. Lam TTY, Jia N, Zhang YW, et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020;583:282–5; <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2169-0>

30. Mousavizadeh L, Ghasemi S. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021;54:159–63; <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2020.03.022>
31. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181:271-280.e8; <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
32. Wu A, Peng Y, Huang B, et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe.* 2020;27:325–8; <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2020.02.001>
33. Konno Y, Kimura I, Uriu K, et al. SARS-CoV-2 ORF3b is a potent interferon antagonist whose activity is further increased by a naturally occurring elongation variant. *bioRxiv.* 2020;2020.05.11.088179; <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.088179>
34. Zimmermann L, Zhao X, Makrochyova J, et al. SARS-CoV-2 nsp3 and nsp4 are minimal constituents of a pore spanning replication organelle. *Nat Commun.* 2023;14:7894; <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43666-5>
35. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19:155–70; <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
36. Romano M, Ruggiero A, Squeglia F, et al. A Structural View of SARS-CoV-2 RNA Replication Machinery: RNA Synthesis, Proofreading and Final Capping. *Cells.* 2020;9; <https://doi.org/10.3390/cells9051267>
37. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022;23:3–20; <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
38. Bosch BJ, van der Zee R, de Haan CAM, Rottier PJM. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol.* 2003;77:8801–11; <https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>

39. Chen D, Zhao YG, Zhang H. Endomembrane remodeling in SARS-CoV-2 infection. *Cell Insight*. 2022;1:100031; <https://doi.org/10.1016/j.cellin.2022.100031>
40. Sola I, Almazán F, Zúñiga S, Enjuanes L. Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. *Annu Rev Virol*. 2015;2:265–88; <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-100114-055218>
41. Klein S, Cortese M, Winter SL, et al. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *bioRxiv*. 2020;2020.06.23.167064; <https://doi.org/10.1101/2020.06.23.167064>
42. Du L, He Y, Zhou Y, et al. The spike protein of SARS-CoV--a target for vaccine and therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:226–36; <https://doi.org/10.1038/nrmicro2090>
43. Peacock TP, Penrice-Randal R, Hiscox JA, Barclay WS. SARS-CoV-2 one year on: evidence for ongoing viral adaptation. *J Gen Virol*. 2021;102; <https://doi.org/10.1099/JGV.0.001584>
44. Lu L, Sikkema RS, Velkers FC, et al. Adaptation, spread and transmission of SARS-CoV-2 in farmed minks and associated humans in the Netherlands. *Nat Commun* 2021 121. 2021;12:1–12; <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27096-9>
45. Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21:162–77; <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00841-7>
46. Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2. <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.
47. Karim SSA, Karim QA. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. *Lancet* (London, England). 2021;398:2126–8; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02758-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02758-6)
48. Declaración sobre la actualización de las definiciones de trabajo y del sistema de seguimiento de las variantes preocupantes y las variantes de interés del SARS-CoV-2. <https://www.who.int/es/news/item/16-03-2023-statement-on-the-update-of-who-s-working-de>.

49. Kamble P, Daulatabad V, Singhal A, et al. JN.1 variant in enduring COVID-19 pandemic: is it a variety of interest (VoI) or variety of concern (VoC)? *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2024;45:49–53; <https://doi.org/10.1515/hmbci-2023-0088>
50. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>.
51. Pattemore PK, Jennings LC. *Epidemiology of Respiratory Infections.* *Pediatr Respir Med.* Elsevier; 2008. p. 435–52; <https://doi.org/10.1016/B978-032304048-8.50035-9>
52. Chia PY, Coleman KK, Tan YK, et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. *Nat Commun* 2020 111. 2020;11:1–7; <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16670-2>
53. Armani Khatibi E, Farshbaf Moghimi N, Rahimpour E. COVID-19: An overview on possible transmission ways, sampling matrices and diagnosis. *Bioimpacts.* 2024;14:29968; <https://doi.org/10.34172/bi.2024.29968>
54. Wong YP, Tan GC, Khong TY. SARS-CoV-2 Transplacental Transmission: A Rare Occurrence? An Overview of the Protective Role of the Placenta. *Int J Mol Sci.* 2023;24; <https://doi.org/10.3390/IJMS24054550>
55. Tang JW, Bahnfleth WP, Bluysen PM, et al. Dismantling myths on the airborne transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J Hosp Infect.* 2021;110:89–96;
56. Linka K, Peirlinck M, Kuhl E. The reproduction number of COVID-19 and its correlation with public health interventions. *Comput Mech.* 2020;66:1035–50; <https://doi.org/10.1007/s00466-020-01880-8>
57. Wilder-Smith A. COVID-19 in comparison with other emerging viral diseases: risk of geographic spread via travel. *Trop Dis Travel Med Vaccines.* 2021;7:1–11; <https://doi.org/10.1186/S40794-020-00129-9/METRICS>
58. Wang B, Andraweera P, Elliott S, et al. Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection by Age: A Global Systematic Review and Meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2022;42:232; <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003791>

59. Conceicao EP, Xu Y, Chan SL, et al. Incubation Periods of SARS-CoV-2 Wild-Type, Delta, and Omicron Variants—Dominant Periods in Singapore. *COVID*. 2024;4:1578–84; <https://doi.org/10.3390/COVID4100109/S1>
60. Lamers MM, Haagmans BL. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20:270–84; <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
61. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020;20:363–74; <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
62. Zheng M, Karki R, Williams EP, et al. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat Immunol*. 2021;22:829–38; <https://doi.org/10.1038/S41590-021-00937-X>
63. Zhao Y, Kuang M, Li J, et al. Publisher Correction: SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR4. *Cell Res*. 2021;31:825; <https://doi.org/10.1038/S41422-021-00501-0>
64. Tamir H, Melamed S, Erez N, et al. Induction of Innate Immune Response by TLR3 Agonist Protects Mice against SARS-CoV-2 Infection. *Viruses*. 2022;14; <https://doi.org/10.3390/V14020189>
65. van der Sluis RM, Cham LB, Gris-Oliver A, et al. TLR2 and TLR7 mediate distinct immunopathological and antiviral plasmacytoid dendritic cell responses to SARS-CoV-2 infection. *EMBO J*. 2022;41; <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021109622>
66. Khalifa AE, Ghoneim AI. Potential value of pharmacological agents acting on toll-like receptor (TLR) 7 and/or TLR8 in COVID-19. *Curr Res Pharmacol drug Discov*. 2021;2; <https://doi.org/10.1016/J.CRPHAR.2021.100068>
67. Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest*. 2020;130:2620–9; <https://doi.org/10.1172/JCI137244>
68. Yang D, Geng T, Harrison AG, Wang P. Differential roles of RIG-I-like receptors in SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv Prepr Serv Biol*. 2021; <https://doi.org/10.1101/2021.02.10.430677>

69. Yin X, Riva L, Pu Y, et al. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. *Cell Rep.* 2021;34; <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108628>
70. Katz DH, Tahir UA, Ngo D, et al. Proteomic Profiling in Biracial Cohorts Implicates DC-SIGN as a Mediator of Genetic Risk in COVID-19. *medRxiv.* 2020;2020.06.09.20125690; <https://doi.org/10.1101/2020.06.09.20125690>
71. Thépaut M, Luczkowiak J, Vivès C, et al. DC/L-SIGN recognition of spike glycoprotein promotes SARS-CoV-2 trans-infection and can be inhibited by a glycomimetic antagonist. *PLoS Pathog.* 2021;17; <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009576>
72. Lu Q, Liu J, Zhao S, et al. SARS-CoV-2 exacerbates proinflammatory responses in myeloid cells through C-type lectin receptors and TWEET family member 2. *Immunity.* 2021;54:1304–1319.e9; <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2021.05.006>
73. Malireddi RKS, Sharma BR, Kanneganti T-D. Innate Immunity in Protection and Pathogenesis During Coronavirus Infections and COVID-19. *Annu Rev Immunol.* 2024;42:615–45; <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-083122-043545>
74. Borges L, Pithon-Curi TC, Curi R, Hatanaka E. COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:8829674; <https://doi.org/10.1155/2020/8829674>
75. Simadibrata DM, Calvin J, Wijaya AD, Ibrahim NAA. Neutrophil-to-lymphocyte ratio on admission to predict the severity and mortality of COVID-19 patients: A meta-analysis. *Am J Emerg Med.* 2021;42:60–9; <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2021.01.006>
76. Meizlish ML, Pine AB, Bishai JD, et al. A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19. *Blood Adv.* 2021;5:1164–77; <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003568>
77. Bhardwaj A, Sapra L, Saini C, et al. COVID-19: Immunology, Immunopathogenesis and Potential Therapies. *Int Rev Immunol.* 2022;41:171–206; <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1883600>

78. Birra D, Benucci M, Landolfi L, et al. COVID 19: a clue from innate immunity. *Immunol Res.* 2020;68:161–8; <https://doi.org/10.1007/S12026-020-09137-5>
79. Melms JC, Biermann J, Huang H, et al. A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19. *Nature.* 2021;595:114–9; <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03569-1>
80. Peebles RS, Graham BS. Viruses, dendritic cells and the lung. *Respir Res.* 2001;2:245–9; <https://doi.org/10.1186/rr63>
81. Wilk AJ, Rustagi A, Zhao NQ, et al. A single-cell atlas of the peripheral immune response to severe COVID-19. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci.* 2020; <https://doi.org/10.1101/2020.04.17.20069930>
82. Spiegel M, Schneider K, Weber F, et al. Interaction of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus with dendritic cells. *J Gen Virol.* 2006;87:1953–60; <https://doi.org/10.1099/VIR.0.81624-0>
83. Taghizadeh-Hesary F, Akbari H. The powerful immune system against powerful COVID-19: A hypothesis. *Med Hypotheses.* 2020;140; <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2020.109762>
84. Murdaca G, Di Gioacchino M, Greco M, et al. Basophils and Mast Cells in COVID-19 Pathogenesis. *Cells.* 2021;10; <https://doi.org/10.3390/CELLS10102754>
85. Kim DM, Kim Y, Seo JW, et al. Enhanced eosinophil-mediated inflammation associated with antibody and complement-dependent pneumonic insults in critical COVID-19. *Cell Rep.* 2021;37; <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109798>
86. Lourda M, Dzidic M, Hertwig L, et al. High-dimensional profiling reveals phenotypic heterogeneity and disease-specific alterations of granulocytes in COVID-19. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118; <https://doi.org/10.1073/PNAS.2109123118/-/DCSUPPLEMENTAL>
87. Togami Y, Matsumoto H, Yoshimura J, et al. Significance of interferon signaling based on mRNA-microRNA integration and plasma protein analyses in critically ill COVID-19 patients. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2022;29:343–53; <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2022.07.005>

88. Panda M, Kalita E, Singh S, et al. MiRNA-SARS-CoV-2 dialogue and prospective anti-COVID-19 therapies. *Life Sci.* 2022;305:120761; <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120761>
89. Lei X, Dong X, Ma R, et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat Commun.* 2020;11; <https://doi.org/10.1038/S41467-020-17665-9>
90. BURKE JM, ST CLAIR LA, PERERA R, PARKER R. SARS-CoV-2 infection triggers widespread host mRNA decay leading to an mRNA export block. *RNA.* 2021;27:1318–29; <https://doi.org/10.1261/RNA.078923.121>
91. Zhang K, Miorin L, Makio T, et al. Nsp1 protein of SARS-CoV-2 disrupts the mRNA export machinery to inhibit host gene expression. *Sci Adv.* 2021;7; <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABE7386>
92. Lapointe CP, Grosely R, Johnson AG, et al. Dynamic competition between SARS-CoV-2 NSP1 and mRNA on the human ribosome inhibits translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2021;118; <https://doi.org/10.1073/PNAS.2017715118/-/DCSUPPLEMENTAL>
93. Banerjee AK, Blanco MR, Bruce EA, et al. SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell.* 2020;183:1325-1339.e21; <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.10.004>
94. Chen K, Xiao F, Hu D, et al. SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Interacts with RIG-I and Represses RIG-Mediated IFN- β Production. *Viruses.* 2020;13; <https://doi.org/10.3390/V13010047>
95. Sui L, Zhao Y, Wang W, et al. SARS-CoV-2 Membrane Protein Inhibits Type I Interferon Production Through Ubiquitin-Mediated Degradation of TBK1. *Front Immunol.* 2021;12; <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.662989>
96. Han L, Zhuang MW, Deng J, et al. SARS-CoV-2 ORF9b antagonizes type I and III interferons by targeting multiple components of the RIG-I/MDA-5-MAVS, TLR3-TRIF, and cGAS-STING signaling pathways. *J Med Virol.* 2021;93:5376–89; <https://doi.org/10.1002/JMV.27050>

97. Wu J, Shi Y, Pan X, et al. SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO. *Cell Rep.* 2021;34; <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.108761>
98. Li JY, Liao CH, Wang Q, et al. The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Res.* 2020;286; <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2020.198074>
99. Konno Y, Kimura I, Uriu K, et al. SARS-CoV-2 ORF3b Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Rep.* 2020;32; <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.108185>
100. Khan MAAK, Sany MRU, Islam MS, Islam ABMMK. Epigenetic Regulator miRNA Pattern Differences Among SARS-CoV, SARS-CoV-2, and SARS-CoV-2 World-Wide Isolates Delineated the Mystery Behind the Epic Pathogenicity and Distinct Clinical Characteristics of Pandemic COVID-19. *Front Genet.* 2020;11; <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.00765>
101. Rarani FZ, Rashidi B, Jafari Najaf Abadi MH, et al. Cytokines and microRNAs in SARS-CoV-2: What do we know? *Mol Ther Nucleic Acids.* 2022;29:219–42; <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.06.017>
102. Zheng M, Gao Y, Wang G, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020 175. 2020;17:533–5; <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
103. Zhou X, Ye G, Lv Y, et al. IL-6 drives T cell death to participate in lymphopenia in COVID-19. *Int Immunopharmacol.* 2022;111; <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2022.109132>
104. Mazzoni A, Salvati L, Maggi L, et al. Hallmarks of immune response in COVID-19: Exploring dysregulation and exhaustion. *Semin Immunol.* 2021;55; <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2021.101508>
105. Diao B, Wang C, Tan Y, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 2020;11:827; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00827>

106. Boppana S, Qin K, Files JK, et al. SARS-CoV-2-specific circulating T follicular helper cells correlate with neutralizing antibodies and increase during early convalescence. *PLoS Pathog.* 2021;17:1–18; <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009761>
107. Siracusano G, Brombin C, Pastori C, et al. Profiling Antibody Response Patterns in COVID-19: Spike S1-Reactive IgA Signature in the Evolution of SARS-CoV-2 Infection. *Front Immunol.* 2021;12; <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.772239>
108. Notarbartolo S, Ranzani V, Bandera A, et al. Integrated longitudinal immunophenotypic , transcriptional , and repertoire analyses delineate immune responses in patients with COVID-19. *Sci Immunol.* 2021;5021:5021; <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABG5021>
109. Sette A, Crotty S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell.* 2021;184:861–80; <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.01.007>
110. Carvajal JJ, García-Castillo V, Cuellar S V., et al. New insights into the pathogenesis of SARS-CoV-2 during and after the COVID-19 pandemic. *Front Immunol.* 2024;15:1363572; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1363572>
111. Le Bert N, Clapham HE, Tan AT, et al. Highly functional virus-specific cellular immune response in asymptomatic SARS-CoV-2 infection. *J Exp Med.* 2021;218; <https://doi.org/10.1084/JEM.20202617>
112. Fajgenbaum DC, June CH. Cytokine Storm. *N Engl J Med.* 2020;383:2255–73; <https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131>
113. Lucas C, Wong P, Klein J, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature.* 2020;584:463–9; <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2588-Y>
114. Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395:1054–62; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)

115. Liu X, Wang H, Shi S, Xiao J. Association between IL-6 and severe disease and mortality in COVID-19 disease: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med J*. 2022;98:871–9; <https://doi.org/10.1136/POSTGRADMEDJ-2021-139939>
116. Tsai P-H, Lai W-Y, Lin Y-Y, et al. Clinical manifestation and disease progression in COVID-19 infection. *J Chin Med Assoc*. 2021;84:3–8; <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000463>
117. Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020;323:1239–42; <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.2648>
118. Birhanu A, Ayana GM, Merga BT, et al. Incidence and predictors of organ failure among COVID-19 hospitalized adult patients in Eastern Ethiopia. Hospital-based retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*. 2022;22:1–8; <https://doi.org/10.1186/S12879-022-07402-6/TABLES/3>
119. Zaim S, Chong JH, Sankaranarayanan V, Harky A. COVID-19 and Multiorgan Response. *Curr Probl Cardiol*. 2020;45:100618; <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100618>
120. Gadi N, Wu SC, Spihlman AP, Moulton VR. What's Sex Got to Do With COVID-19? Gender-Based Differences in the Host Immune Response to Coronaviruses. *Front Immunol*. 2020;11; <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.02147>
121. Oghumu S, Varikuti S, Stock JC, et al. Cutting Edge: CXCR3 Escapes X Chromosome Inactivation in T Cells during Infection: Potential Implications for Sex Differences in Immune Responses. *J Immunol*. 2019;203:789–94; <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1800931>
122. Laffont S, Rouquié N, Azar P, et al. X-Chromosome complement and estrogen receptor signaling independently contribute to the enhanced TLR7-mediated IFN- α production of plasmacytoid dendritic cells from women. *J Immunol*. 2014;193:5444–52; <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1303400>

123. Sarmiento L, Svensson J, Barchetta I, et al. Copy number of the X-linked genes TLR7 and CD40L influences innate and adaptive immune responses. *Scand J Immunol.* 2019;90; <https://doi.org/10.1111/SJI.12776>
124. Arnold CG, Libby A, Vest A, et al. Immune mechanisms associated with sex-based differences in severe COVID-19 clinical outcomes. *Biol Sex Differ.* 2022;13; <https://doi.org/10.1186/S13293-022-00417-3>
125. Mohamed MS, Moulin TC, Schiöth HB. Sex differences in COVID-19: the role of androgens in disease severity and progression. *Endocrine.* 2021;71:3–8; <https://doi.org/10.1007/S12020-020-02536-6>
126. da Silva JS, Montagnoli TL, Rocha BS, et al. Estrogen Receptors: Therapeutic Perspectives for the Treatment of Cardiac Dysfunction after Myocardial Infarction. *Int J Mol Sci.* 2021;22:1–20; <https://doi.org/10.3390/IJMS22020525>
127. Zimmermann P, Curtis N. Why Does the Severity of COVID-19 Differ With Age?: Understanding the Mechanisms Underlying the Age Gradient in Outcome Following SARS-CoV-2 Infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2022;41:E36–45; <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000003413>
128. Zimmermann P, Curtis N. Why is COVID-19 less severe in children? A review of the proposed mechanisms underlying the age-related difference in severity of SARS-CoV-2 infections. *Arch Dis Child.* 2021;106:429–39; <https://doi.org/10.1136/ARCHDISCHILD-2020-320338>
129. Bartleson JM, Radenkovic D, Covarrubias AJ, et al. SARS-CoV-2, COVID-19 and the Ageing Immune System. *Nat aging.* 2021;1:769–82; <https://doi.org/10.1038/S43587-021-00114-7>
130. Vono M, Huttner A, Lemeille S, et al. Robust innate responses to SARS-CoV-2 in children resolve faster than in adults without compromising adaptive immunity. *Cell Rep.* 2021;37; <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.109773>
131. Cooling L. Blood Groups in Infection and Host Susceptibility. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:801–70; <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-14>

132. Bari A, Ch A, Hareem S, et al. Association of Blood Groups with the Severity and Outcome of COVID-19 Infection in Children. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2021;31:S57–9; <https://doi.org/10.29271/JCPSP.2021.01.S57>
133. Wu Y, Feng Z, Li P, Yu Q. Relationship between ABO blood group distribution and clinical characteristics in patients with COVID-19. *Clin Chim Acta*. 2020;509:220–3; <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2020.06.026>
134. Liu N, Zhang T, Ma L, et al. The impact of ABO blood group on COVID-19 infection risk and mortality: A systematic review and meta-analysis. *Blood Rev*. 2021;48; <https://doi.org/10.1016/J.BLRE.2020.100785>
135. Zeng X, Fan H, Lu D, et al. Association between ABO blood groups and clinical outcome of coronavirus disease 2019: Evidence from two cohorts. *medRxiv*. 2020;2020.04.15.20063107; <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.20063107>
136. Takagi H. Down the Rabbit-Hole of blood groups and COVID-19. *Br J Haematol*. 2020;190:e268–70; <https://doi.org/10.1111/BJH.17059>
137. Guillon P, Clément M, Sébille V, et al. Inhibition of the interaction between the SARS-CoV spike protein and its cellular receptor by anti-histo-blood group antibodies. *Glycobiology*. 2008;18:1085–93; <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWN093>
138. Gérard C, Maggipinto G, Minon JM. COVID-19 and ABO blood group: another viewpoint. *Br J Haematol*. 2020;190:e93–4; <https://doi.org/10.1111/BJH.16884>
139. Zaidi FZ, Zaidi ARZ, Abdullah SM, Zaidi SZA. COVID-19 and the ABO blood group connection. *Transfus Apher Sci*. 2020;59; <https://doi.org/10.1016/J.TRANSCI.2020.102838>
140. Ewald DR, Sumner SCJ. Blood type biochemistry and human disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016;8:517–35; <https://doi.org/10.1002/WSBM.1355>
141. D E, F D, L B, et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *N Engl J Med*. 2020;383:1522–34; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2020283>

142. Dai X. ABO blood group predisposes to COVID-19 severity and cardiovascular diseases. *Eur J Prev Cardiol.* 2020;27:1436–7; <https://doi.org/10.1177/2047487320922370>
143. Sanchis-Gomar F, Lavie CJ, Mehra MR, et al. Obesity and Outcomes in COVID-19: When an Epidemic and Pandemic Collide. *Mayo Clin Proc.* 2020;95:1445–53; <https://doi.org/10.1016/J.MAYOCP.2020.05.006>
144. Popkin BM, Du S, Green WD, et al. Individuals with obesity and COVID-19: A global perspective on the epidemiology and biological relationships. *Obes Rev.* 2020;21; <https://doi.org/10.1111/OBR.13128>
145. Krams IA, Luoto S, Rantala MJ, et al. Covid-19: Fat, Obesity, Inflammation, Ethnicity, and Sex Differences. *Pathog (Basel, Switzerland).* 2020;9:1–10; <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9110887>
146. Roy S, Demmer RT. Impaired glucose regulation, SARS-CoV-2 infections and adverse COVID-19 outcomes. *Transl Res.* 2022;241:52–69; <https://doi.org/10.1016/J.TRSL.2021.11.002>
147. Smith SM, Boppana A, Traupman JA, et al. Impaired glucose metabolism in patients with diabetes, prediabetes, and obesity is associated with severe COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93:409–15; <https://doi.org/10.1002/JMV.26227>
148. Herman-Edelstein M, Guetta T, Barnea A, et al. Expression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 in human heart is associated with uncontrolled diabetes, obesity, and activation of the renin angiotensin system. *Cardiovasc Diabetol.* 2021;20; <https://doi.org/10.1186/S12933-021-01275-W>
149. Brufsky A. Hyperglycemia, hydroxychloroquine, and the COVID-19 pandemic. *J Med Virol.* 2020;92:770–5; <https://doi.org/10.1002/JMV.25887>
150. Bornstein SR, Dalan R, Hopkins D, et al. Endocrine and metabolic link to coronavirus infection. *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16:297–8; <https://doi.org/10.1038/S41574-020-0353-9>

151. Shkurnikov MY, Averinskaya DA, Komarov AG, et al. Association of HLA Class I Genotype with Mortality in Patients with Diabetes Mellitus and COVID-19. *Dokl Biochem Biophys.* 2022;507:289–93; <https://doi.org/10.1134/S1607672922060114>
152. Aparisi Á, Martín-Fernández M, Ybarra-Falcón C, et al. Dyslipidemia and Inflammation as Hallmarks of Oxidative Stress in COVID-19: A Follow-Up Study. *Int J Mol Sci.* 2022;23; <https://doi.org/10.3390/IJMS232315350>
153. Codo AC, Davanzo GG, Monteiro L de B, et al. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metab.* 2020;32:437-446.e5; <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2020.07.007>
154. Zhou R, To KKW, Wong YC, et al. Acute SARS-CoV-2 Infection Impairs Dendritic Cell and T Cell Responses. *Immunity.* 2020;53:864-877.e5; <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2020.07.026>
155. Cai R, Zhang J, Zhu Y, et al. Mortality in chronic kidney disease patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol.* 2021;53:1623–9; <https://doi.org/10.1007/S11255-020-02740-3>
156. Rabaan AA, Smajlović S, Tombuloglu H, et al. SARS-CoV-2 infection and multi-organ system damage: A review. *Biomol Biomed.* 2023;23:37–52; <https://doi.org/10.17305/BJBMS.2022.7762>
157. Stockmann H, Hardenberg JHB, Aigner A, et al. High rates of long-term renal recovery in survivors of coronavirus disease 2019-associated acute kidney injury requiring kidney replacement therapy. *Kidney Int.* 2021;99:1021–2; <https://doi.org/10.1016/J.KINT.2021.01.005>
158. Nishiga M, Wang DW, Han Y, et al. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:543–58; <https://doi.org/10.1038/S41569-020-0413-9>
159. Noori M, Nejadghaderi SA, Sullman MJM, et al. How SARS-CoV-2 might affect potassium balance via impairing epithelial sodium channels? *Mol Biol Rep.* 2021;48:6655–61; <https://doi.org/10.1007/S11033-021-06642-0>

160. Tsampasian V, Corballis N, Vassiliou VS. Renin-Angiotensin-Aldosterone Inhibitors and COVID-19 Infection. *Curr Hypertens Rep.* 2022;24; <https://doi.org/10.1007/S11906-022-01207-3>
161. Goudouris ES, Pinto-Mariz F, Mendonça LO, et al. Outcome of SARS-CoV-2 Infection in 121 Patients with Inborn Errors of Immunity: A Cross-Sectional Study. *J Clin Immunol.* 2021;41:1479–89; <https://doi.org/10.1007/S10875-021-01066-8>
162. Basoulis D, Mastrogianni E, Voutsinas PM, Psychogiou M. HIV and COVID-19 Co-Infection: Epidemiology, Clinical Characteristics, and Treatment. *Viruses.* 2023;15; <https://doi.org/10.3390/V15020577>
163. Belsky JA, Tullius BP, Lamb MG, et al. COVID-19 in immunocompromised patients: A systematic review of cancer, hematopoietic cell and solid organ transplant patients. *J Infect.* 2021;82:329–38; <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2021.01.022>
164. Struyf T, Deeks JJ, Dinnes J, et al. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. *Cochrane database Syst Rev.* 2020;7; <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013665>
165. Dawson P, Rabold EM, Laws RL, et al. Loss of Taste and Smell as Distinguishing Symptoms of Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2021;72:682–5; <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA799>
166. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Domínguez-Gil M, et al. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics* (Basel, Switzerland). 2021;11; <https://doi.org/10.3390/DIAGNOSTICS11030438>
167. IDSA. IDSA Guidelines on the diagnosis of COVID-19: molecular diagnostic testing. 2020 May 6. Available from: <https://www.idsociety.org/practice-guideline/covid-19-guideline-diagnostics/>
168. WHO. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases World Health Organization [Internet]. 2020 Mar 19. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>

169. Cheng MP, Papenburg J, Desjardins M, et al. Diagnostic Testing for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2: A Narrative Review. *Ann Intern Med.* 2020;172:726–34; <https://doi.org/10.7326/M20-1301>
170. Pecoraro V, Negro A, Pirotti T, Trenti T. Estimate false-negative RT-PCR rates for SARS-CoV-2. A systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2022;52:e13706; <https://doi.org/10.1111/eci.13706>
171. Dinnes J, Deeks JJ, Adriano A, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;2020;
172. Cheng MP, Yansouni CP, Basta NE, et al. Serodiagnostics for Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus 2 : A Narrative Review. *Ann Intern Med.* 2020;173:450–60; <https://doi.org/10.7326/M20-2854>
173. Alsayed AR, Ahmed SI, Shweiki AOAL, et al. The laboratory parameters in predicting the severity and death of COVID-19 patients: Future pandemic readiness strategies. *Biomol Biomed.* 2024;24:238–55; <https://doi.org/10.17305/BB.2023.9540>
174. Bhimraj A, Morgan RL, Shumaker AH, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Treatment and Management of Patients With COVID-19 (April 2020). *Clin Infect Dis.* 2024;78:e83–102; <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA478>
175. Xie C, Wang S, Zhou J, et al. Albumin level as an independent predictive factor for adverse outcomes in COVID-19 patients: a retrospective cohort study. *J Infect Dev Ctries.* 2022;16:1696–702; <https://doi.org/10.3855/JIDC.16880>
176. Battaglini D, Lopes-Pacheco M, Castro-Faria-Neto HC, et al. Laboratory Biomarkers for Diagnosis and Prognosis in COVID-19. *Front Immunol.* 2022;13:857573; <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.857573/BIBTEX>
177. Fang FC, Naccache SN, Greninger AL. The Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019- Frequently Asked Questions. *Clin Infect Dis.* 2020;71:2996–3001; <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA742>

178. Olson JD. D-dimer: An Overview of Hemostasis and Fibrinolysis, Assays, and Clinical Applications. *Adv Clin Chem.* 2015;69:1–46; <https://doi.org/10.1016/BS.ACC.2014.12.001>
179. Paliogiannis P, Mangoni AA, Dettori P, et al. D-Dimer Concentrations and COVID-19 Severity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front public Heal.* 2020;8:432; <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00432>
180. Plebani M. Why C-reactive protein is one of the most requested tests in clinical laboratories? *Clin Chem Lab Med.* 2023;61:1540–5; <https://doi.org/10.1515/CCLM-2023-0086>
181. Volanakis JE. Human C-reactive protein: Expression, structure, and function. *Mol Immunol.* 2001;38:189–97; [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00042-6)
182. Du Clos TW, Mold C. C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunol Res.* 2004;30:261–77; <https://doi.org/10.1385/IR:30:3:261>
183. Hage FG, Szalai AJ. C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50:1115–22; <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2007.06.012>
184. Wang L. C-reactive protein levels in the early stage of COVID-19. *Med Mal Infect.* 2020;50:332–4; <https://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2020.03.007>
185. Poggiali E, Zaino D, Immovilli P, et al. Lactate dehydrogenase and C-reactive protein as predictors of respiratory failure in CoVID-19 patients. *Clin Chim Acta.* 2020;509:135–8; <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2020.06.012>
186. Bannaga AS, Tabuso M, Farrugia A, et al. C-reactive protein and albumin association with mortality of hospitalised SARS-CoV-2 patients: A tertiary hospital experience. *Clin Med.* 2020;20:463–7; <https://doi.org/10.7861/CLINMED.2020-0424>
187. Fialek B, Pruc M, Smereka J, et al. Diagnostic value of lactate dehydrogenase in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Cardiol J.* 2022;29:751–8; <https://doi.org/10.5603/CJ.A2022.0056>

188. Li Z, Wu M, Yao J, et al. Caution on Kidney Dysfunctions of COVID-19 Patients. medRxiv. 2020;2020.02.08.20021212; <https://doi.org/10.1101/2020.02.08.20021212>
189. Cowman K, Rossi J, Gendlina I, et al. Elucidating the role of procalcitonin as a biomarker in hospitalized COVID-19 patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2022;103:115721; <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2022.115721>
190. Cozzi A, Corsi B, Levi S, et al. Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. J Biol Chem. 2000;275:25122–9; <https://doi.org/10.1074/JBC.M003797200>
191. Mahroum N, Alghory A, Kiyak Z, et al. Ferritin - from iron, through inflammation and autoimmunity, to COVID-19. J Autoimmun. 2022;126:102778; <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102778>
192. Shi S, Qin M, Shen B, et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. JAMA Cardiol. 2020;5:802–10; <https://doi.org/10.1001/JAMACARDIO.2020.0950>
193. Lombardi CM, Carubelli V, Iorio A, et al. Association of Troponin Levels With Mortality in Italian Patients Hospitalized With Coronavirus Disease 2019: Results of a Multicenter Study. JAMA Cardiol. 2020;5:1274–80; <https://doi.org/10.1001/JAMACARDIO.2020.3538>
194. Baigent C, Windecker S, Andreini D, et al. ESC guidance for the diagnosis and management of cardiovascular disease during the COVID-19 pandemic: part 2—care pathways, treatment, and follow-up. Eur Heart J. 2022;43:1059–103; <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHAB697>
195. Herold T, Jurinovic V, Arnreich C, et al. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19. J Allergy Clin Immunol. 2020;146:128-136.e4; <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2020.05.008>
196. Yuan Y, Jiao B, Qu L, et al. The development of COVID-19 treatment. Front Immunol. 2023;14:1125246; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125246>
197. Focosi D, Franchini M, Maggi F, Shoham S. COVID-19 therapeutics. Clin Microbiol Rev. 2024;37; <https://doi.org/10.1128/CMR.00119-23>

198. Gottlieb RL, Vaca CE, Paredes R, et al. Early Remdesivir to Prevent Progression to Severe Covid-19 in Outpatients. *N Engl J Med.* 2022;386:305–15; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2116846>
199. Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 - Final Report. *N Engl J Med.* 2020;383:1813–26; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2007764>
200. Vaezi A, Salmasi M, Soltaninejad F, et al. Favipiravir in the Treatment of Outpatient COVID-19: A Multicenter, Randomized, Triple-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Adv Respir Med.* 2023;91:18–25; <https://doi.org/10.3390/ARM91010004>
201. Bosaeed M, Alharbi A, Mahmoud E, et al. Efficacy of favipiravir in adults with mild COVID-19: a randomized, double-blind, multicentre, placebo-controlled clinical trial. *Clin Microbiol Infect.* 2022;28:602–8; <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2021.12.026>
202. Udawadia ZF, Singh P, Barkate H, et al. Efficacy and safety of favipiravir, an oral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor, in mild-to-moderate COVID-19: A randomized, comparative, open-label, multicenter, phase 3 clinical trial. *Int J Infect Dis.* 2021;103:62–71; <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2020.11.142>
203. Hung IFN, Lung KC, Tso EYK, et al. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet (London, England).* 2020;395:1695–704; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31042-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31042-4)
204. Cao B, Wang Y, Wen D, et al. A Trial of Lopinavir-Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;382:1787–99; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2001282>
205. Ren Z, Luo H, Yu Z, et al. A Randomized, Open-Label, Controlled Clinical Trial of Azvudine Tablets in the Treatment of Mild and Common COVID-19, a Pilot Study. *Adv Sci (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Ger.* 2020;7; <https://doi.org/10.1002/ADVS.202001435>
206. Mahase E. Covid-19: Molnupiravir reduces risk of hospital admission or death by 50% in patients at risk, MSD reports. *BMJ.* 2021;375:n2422; <https://doi.org/10.1136/BMJ.N2422>

207. Smieszek SP, Przychodzen BP, Polymeropoulos MH. Amantadine disrupts lysosomal gene expression: A hypothesis for COVID19 treatment. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;55; <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106004>
208. Rejdak K, Fiedor P, Bonek R, et al. Amantadine in unvaccinated patients with early, mild to moderate COVID-19: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial. *Eur J Neurol*. 2024;31; <https://doi.org/10.1111/ENE.16045>
209. Cavalcanti AB, Zampieri FG, Rosa RG, et al. Hydroxychloroquine with or without Azithromycin in Mild-to-Moderate Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383:2041–52; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2019014>
210. Chen P, Nirula A, Heller B, et al. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:229–37; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2029849>
211. JD L, B G, CE B, et al. A Neutralizing Monoclonal Antibody for Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384:905–14; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2033130>
212. Dougan M, Nirula A, Azizad M, et al. Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;385:1382–92; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2102685>
213. Iketani S, Liu L, Guo Y, et al. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Nature*. 2022;604:553–6; <https://doi.org/10.1038/S41586-022-04594-4>
214. Wolfe L. Ruxolitinib in Myelofibrosis and Polycythemia Vera. *J Adv Pract Oncol*. 2016;7:436–44; <https://doi.org/10.6004/jadpro.2016.7.4.6>
215. Sørensen AL, Mikkelsen SU, Knudsen TA, et al. Ruxolitinib and interferon- α 2 combination therapy for patients with polycythemia vera or myelofibrosis: a phase II study. *Haematologica*. 2020;105:2262–72; <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.235648>

216. Sterne JAC, Murthy S, Diaz J V., et al. Association Between Administration of Systemic Corticosteroids and Mortality Among Critically Ill Patients With COVID-19: A Meta-analysis. *JAMA*. 2020;324:1330–41; <https://doi.org/10.1001/JAMA.2020.17023>
217. Fernández-Pato A, Virseda-Berdices A, Resino S, et al. Plasma miRNA profile at COVID-19 onset predicts severity status and mortality. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11:676–88; <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2038021>
218. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, et al. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol.* 2020;11:1446; <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01446>
219. Bivona G, Agnello L, Ciaccio M. Biomarkers for Prognosis and Treatment Response in COVID-19 Patients. *Ann Lab Med.* 2021;41:540–8; <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.6.540>
220. Liu F, Li L, Xu M, et al. Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19. *J Clin Virol.* 2020;127:104370; <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104370>
221. Fu Z, Wang J, Wang Z, et al. A virus-derived microRNA-like small RNA serves as a serum biomarker to prioritize the COVID-19 patients at high risk of developing severe disease. *Cell Discov.* 2021;7:48; <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00289-8>
222. Jain V, Kumar P, Panda PK, et al. Utility of IL-6 in the Diagnosis, Treatment and Prognosis of COVID-19 Patients: A Longitudinal Study. *Vaccines.* 2022;10; <https://doi.org/10.3390/vaccines10111786>
223. Snopkowska Lesniak SW, Maschio D, Neria F, et al. Novel Biomarkers for SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pers Med.* 2025;15; <https://doi.org/10.3390/jpm15060225>
224. Park CL, Russell BS, Fendrich M, et al. Americans' COVID-19 Stress, Coping, and Adherence to CDC Guidelines. *J Gen Intern Med.* 2020;35:2296–303; <https://doi.org/10.1007/s11606-020-05898-9>

225. Hu B, Huang S, Yin L. The cytokine storm and COVID-19. *J Med Virol.* 2021;93:250–6; <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>
226. Gupta KK, Khan MA, Singh SK. Constitutive Inflammatory Cytokine Storm: A Major Threat to Human Health. *J Interferon Cytokine Res.* 2020;40:19–23; <https://doi.org/10.1089/jir.2019.0085>
227. Wen W, Su W, Tang H, et al. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing. *Cell Discov.* 2020;6:1–18; <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0168-9>
228. Zhang B, Zhou X, Zhu C, et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. *Front Mol Biosci.* 2020;7; <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00157>
229. Xu J bo, Xu C, Zhang R bing, et al. Associations of procalcitonin, C-reaction protein and neutrophil-to-lymphocyte ratio with mortality in hospitalized COVID-19 patients in China. *Sci Rep.* 2020;10:1–10; <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72164-7>
230. Quartuccio L, Fabris M, Sonaglia A, et al. Interleukin 6, soluble interleukin 2 receptor alpha (CD25), monocyte colony-stimulating factor, and hepatocyte growth factor linked with systemic hyperinflammation, innate immunity hyperactivation, and organ damage in COVID-19 pneumonia. *Cytokine.* 2021;140:155438; <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155438>
231. Yang Y, Shen C, Li J, et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;146:119-127.e4; <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.027>
232. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, et al. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA.* 2020;324:782–93; <https://doi.org/10.1001/jama.2020.12839>
233. Hoiland RL, Fergusson NA, Mitra AR, et al. The association of ABO blood group with indices of disease severity and multiorgan dysfunction in COVID-19. *Blood Adv.* 2020;4:4981–9; <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002623>

234. Amundadottir L, Kraft P, Stolzenberg-Solomon RZ, et al. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet.* 2009;41:986–90; <https://doi.org/10.1038/ng.429>
235. Huang I, Pranata R, Lim MA, et al. C-reactive protein, procalcitonin, D-dimer, and ferritin in severe coronavirus disease-2019: a meta-analysis. *Ther Adv Respir Dis.* 2020;14; <https://doi.org/10.1177/1753466620937175>
236. Caricchio R, Gallucci M, Dass C, et al. Preliminary predictive criteria for COVID-19 cytokine storm. *Ann Rheum Dis.* 2021;80:88–95; <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-218323>
237. Caricchio R, Gallucci M, Dass C, et al. Response to: ‘Correspondence on “Preliminary predictive criteria for COVID-19 cytokine storm”’ by Tampe et al. *Ann Rheum Dis.* 2021; <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2020-219720>
238. Zhang X, Tan Y, Ling Y, et al. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. *Nature.* 2020;583:437–40; <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2355-0>,
239. Liu J, Li S, Liu J, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine.* 2020;55;
240. Bindoli S, Felicetti M, Sfriso P, Doria A. The amount of cytokine-release defines different shades of Sars-Cov2 infection. *Exp Biol Med (Maywood).* 2020;245:970–6; <https://doi.org/10.1177/1535370220928964>
241. Dorgham K, Quentric P, Gökkaya M, et al. Distinct cytokine profiles associated with COVID-19 severity and mortality. *J Allergy Clin Immunol.* 2021; <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.03.047>
242. Zhang L, Han C, Zhang S, et al. Diarrhea and altered inflammatory cytokine pattern in severe coronavirus disease 2019: Impact on disease course and in-hospital mortality. *J Gastroenterol Hepatol.* 2021;36:421–9; <https://doi.org/10.1111/JGH.15166>,
243. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111:S460-75; <https://doi.org/10.1067/mai.2003.108>

244. Tamayo-Velasco Á, Martínez-Paz P, Peñarrubia-Ponce MJ, et al. HGF, IL-1 α , and IL-27 Are Robust Biomarkers in Early Severity Stratification of COVID-19 Patients. *J Clin Med*. 2021;10:2017; <https://doi.org/10.3390/jcm10092017>
245. Slaats J, Oever J ten, Veerdonk FL van de, Netea MG. IL-1 β /IL-6/CRP and IL-18/ferritin: Distinct Inflammatory Programs in Infections. *PLOS Pathog*. 2016;12:e1005973; <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1005973>
246. Shannon JM, Wikenheiser-Brokamp KA, Greenberg JM. Lung Growth and Development. *Murray Nadel's Textb Respir Med Vol 1,2, Sixth Ed*. 2016;1:22-31.e4; <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3383-5.00002-6>
247. Wang C, Xie J, Zhao L, et al. Alveolar macrophage dysfunction and cytokine storm in the pathogenesis of two severe COVID-19 patients. *EBioMedicine*. 2020;57; <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102833>
248. Cauchois R, Koubi M, Delarbre D, et al. Early IL-1 receptor blockade in severe inflammatory respiratory failure complicating COVID-19. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117:18951–3; <https://doi.org/10.1073/pnas.2009017117>
249. Dinarello CA, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol*. 2013;4:57626; <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2013.00289/XML>
250. Kerget B, Kerget F, Aksakal A, et al. Evaluation of alpha defensin, IL-1 receptor antagonist, and IL-18 levels in COVID-19 patients with macrophage activation syndrome and acute respiratory distress syndrome. *J Med Virol*. 2021;93:2090–8; <https://doi.org/10.1002/JMV.26589>,
251. Li S, Jiang L, Beckmann K, et al. A novel anti-human IL-1R7 antibody reduces IL-18-mediated inflammatory signaling. *J Biol Chem*. 2021;296; <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100630>
252. Huaux F, Gharaee-Kermani M, Liu T, et al. Role of eotaxin-1 (CCL11) and CC chemokine receptor 3 (CCR3) in bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *Am J Pathol*. 2005;167:1485–96; [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61235-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61235-7)

253. Mattoli S, Stacey MA, Sun G, et al. Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236:299–301; <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6958>
254. Reber L, Da Silva CA, Frossard N. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006;533:327–40; <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.067>
255. Y C, J W, C L, et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol Med.* 2020;26; <https://doi.org/10.1186/S10020-020-00230-X>
256. Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, et al. Autopsy findings and venous thromboembolism in patients with COVID-19: A prospective cohort study. *Ann Intern Med.* 2020;173:268–77; <https://doi.org/10.7326/M20-2003>
257. Nicolai L, Leunig A, Brambs S, et al. Vascular neutrophilic inflammation and immunothrombosis distinguish severe COVID-19 from influenza pneumonia. *J Thromb Haemost.* 2021;19:574–81; <https://doi.org/10.1111/jth.15179>
258. Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, et al. Brain-derived neurotrophic factor: A bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci.* 2014;8; <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00430>,
259. Azoulay D, Shehadeh M, Chepa S, et al. Recovery from SARS-CoV-2 infection is associated with serum BDNF restoration. *J Infect.* 2020;81:e79; <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2020.06.038>
260. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:595–601; <https://doi.org/10.1038/nri1901>
261. Verbist KC, Klonowski KD. Functions of IL-15 in anti-viral immunity: multiplicity and variety. *Cytokine.* 2012;59:467–78; <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.05.020>
262. Kandikattu HK, Venkateshaiah SU, Kumar S, Mishra A. IL-15 immunotherapy is a viable strategy for COVID-19. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;54:24–31; <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.06.008>

263. Xu C, He X, Zheng Z, et al. Downregulation of microRNA miR-526a by enterovirus inhibits RIG-I-dependent innate immune response. *J Virol.* 2014;88:11356–68; <https://doi.org/10.1128/JVI.01400-14>
264. Shrivastava S, Steele R, Ray R, Ray RB. MicroRNAs: Role in Hepatitis C Virus pathogenesis. *Genes Dis.* 2015;2:35–45; <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.01.001>
265. Fu L, Fu X, Mo J, et al. miR-146a-5p enhances hepatitis B virus replication through autophagy to promote aggravation of chronic hepatitis B. *IUBMB Life.* 2019;71:1336–46; <https://doi.org/10.1002/iub.2044>
266. Othumpangat S, Walton C, Piedimonte G. MicroRNA-221 modulates RSV replication in human bronchial epithelium by targeting NGF expression. *PLoS One.* 2012;7:e30030; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030030>
267. Liang Y, Fang D, Gao X, et al. Circulating microRNAs as emerging regulators of COVID-19. *Theranostics.* 2023;13:125–47; <https://doi.org/10.7150/THNO.78164>
268. Aslani M, Mortazavi-Jahromi SS, Mirshafiey A. Cytokine storm in the pathophysiology of COVID-19: Possible functional disturbances of miRNAs. *Int Immunopharmacol.* 2021;101:108172; <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108172>
269. Drilon A, Cappuzzo F, Ou SHI, Camidge DR. Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET? *J Thorac Oncol.* 2017;12:15–26; <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.014>
270. Zhang Q, Xu M, Qu Y, et al. Analysis of the differential expression of circulating microRNAs during the progression of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Mol Med Rep.* 2015;12:5647–54; <https://doi.org/10.3892/MMR.2015.4221>
271. Zhang W, Jia J, Liu Z, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for Sepsis secondary to pneumonia diagnosed via Sepsis 3.0. *BMC Pulm Med.* 2019;19; <https://doi.org/10.1186/S12890-019-0836-4>
272. Zhu M, Ma X, Huang J, et al. Extracellular vesicle-derived miR-1249–5p regulates influenza A virus-induced acute lung injury in RAW246.7 cells through targeting SLC4A1. *Microbes Infect.* 2022;24; <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.104998>

273. Noth I, Roy J, Schmid R, et al. Relationship Between mRNA-microRNA Interactions and Forced Vital Capacity in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *ATS 2020 Int Conf Am Thorac Soc Int Conf Meet Abstr.* 2020;A6145–A6145; https://doi.org/10.1164/AJRCCM-CONFERENCE.2020.201.1_MEETINGABSTRACTS.A6145
274. Fang H, Sun Z, Chen Z, et al. Bioinformatics and systems-biology analysis to determine the effects of Coronavirus disease 2019 on patients with allergic asthma. *Front Immunol.* 2022;13; <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.988479>
275. Buzás EI, Tóth EÁ, Sódar BW, Szabó-Taylor KÉ. Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Semin Immunopathol.* 2018;40:453–64; <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0682-0>
276. Bauer W, Ulke J, Galtung N, et al. Role of Cell Adhesion Molecules for Prognosis of Disease Development of Patients With and Without COVID-19 in the Emergency Department. *J Infect Dis.* 2021;223:1497–9; <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIAB042>
277. Kleer M, Mulloy RP, Robinson CA, et al. Human coronaviruses disassemble processing bodies. *PLoS Pathog.* 2022;18; <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1010724>
278. Declercq J, De Leeuw E, Lambrecht BN. Inflammasomes and IL-1 family cytokines in SARS-CoV-2 infection: from prognostic marker to therapeutic agent. *Cytokine.* 2022;157; <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155934>
279. Venkatesan G, Wan Ab Rahman WS, Shahidan WNS, et al. Plasma-derived exosomal miRNA as potential biomarker for diagnosis and prognosis of vector-borne diseases: A review. *Front Microbiol.* 2023;14; <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1097173>
280. Tian F, Shen Y, Chen Z, et al. No significant difference between plasma miRNAs and plasma-derived exosomal miRNAs from healthy people. *Biomed Res Int.* 2017;2017; <https://doi.org/10.1155/2017/1304816>

281. Endzelinš E, Berger A, Melne V, et al. Detection of circulating miRNAs: Comparative analysis of extracellular vesicle-incorporated miRNAs and cell-free miRNAs in whole plasma of prostate cancer patients. *BMC Cancer*. 2017;17; <https://doi.org/10.1186/S12885-017-3737-Z>
282. He B, Zhou W, Rui Y, et al. MicroRNA-574-5p attenuates acute respiratory distress syndrome by targeting HMGB1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2021;64:196–207; <https://doi.org/10.1165/RCMB.2020-0112OC>
283. Sabetian S, Castiglioni I, Jahromi BN, et al. In silico identification of mirna–lncrna interactions in male reproductive disorder associated with COVID-19 infection. *Cells*. 2021;10; <https://doi.org/10.3390/CELLS10061480>
284. Singh Y, Kaul V, Mehra A, et al. Mycobacterium tuberculosis controls MicroRNA-99b (miR-99b) expression in infected murine dendritic cells to modulate host immunity. *J Biol Chem*. 2013;288:5056–61; <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.439778>
285. Calderon-Dominguez M, Trejo-Gutierrez E, González-Rovira A, et al. Serum microRNAs targeting ACE2 and RAB14 genes distinguish asymptomatic from critical COVID-19 patients. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022;29:76–87; <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.06.006>
286. Hermann S, Brandes F, Kirchner B, et al. Diagnostic potential of circulating cell-free microRNAs for community-acquired pneumonia and pneumonia-related sepsis. *J Cell Mol Med*. 2020;24:12054–64; <https://doi.org/10.1111/JCMM.15837>
287. M A, SE V, M K, et al. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383:120–8; <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2015432>
288. Kim WR, Park EG, Kang KW, et al. Expression analyses of micrnas in hamster lung tissues infected by sars-cov-2. *Mol Cells*. 2020;43:953–63; <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2020.0177>
289. Chow JTS, Salmena L. Prediction and analysis of SARS-CoV-2-targeting microrna in human lung epithelium. *Genes (Basel)*. 2020;11:1–12; <https://doi.org/10.3390/GENES11091002>

290. Galluzzo A, Gallo S, Pardini B, et al. Identification of novel circulating microRNAs in advanced heart failure by next-generation sequencing. *ESC Hear Fail.* 2021;8:2907–19; <https://doi.org/10.1002/EHF2.13371>
291. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res.* 2010;106:1035–9; <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.218297>
292. Farr RJ, Rootes CL, Rowntree LC, et al. Altered microRNA expression in COVID-19 patients enables identification of SARS-CoV-2 infection. *PLoS Pathog.* 2021;17; <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009759>
293. Akula SM, Bolin P, Cook PP. Cellular miR-150-5p may have a crucial role to play in the biology of SARS-CoV-2 infection by regulating nsp10 gene. *RNA Biol.* 2022;19:1–11; <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.2010959>
294. Morán J, Ramírez-Martínez G, Jiménez-Alvarez L, et al. Circulating levels of miR-150 are associated with poorer outcomes of A/H1N1 infection. *Exp Mol Pathol.* 2015;99:253–61; <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.07.001>
295. Bezman NA, Chakraborty T, Bender T, Lanier LL. MiR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *J Exp Med.* 2011;208:2717–31; <https://doi.org/10.1084/JEM.20111386>
296. Kim CW, Oh JE, Lee HK. Single cell transcriptomic re-analysis of immune cells in bronchoalveolar lavage fluids reveals the correlation of b cell characteristics and disease severity of patients with sars-cov-2 infection. *Immune Netw.* 2021;21:1–13; <https://doi.org/10.4110/IN.2021.21.E10>
297. Papangelis I, Kim J, Maier I, et al. MicroRNA 139-5p coordinates APLNR-CXCR4 crosstalk during vascular maturation. *Nat Commun.* 2016;7; <https://doi.org/10.1038/NCOMMS11268>
298. Martínez-Fleta P, Vera-Tomé P, Jiménez-Fernández M, et al. A Differential Signature of Circulating miRNAs and Cytokines Between COVID-19 and Community-Acquired Pneumonia Uncovers Novel Physiopathological Mechanisms of COVID-19. *Front Immunol.* 2022;12; <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.815651>

299. Zhang H, Zheng H, Zhu J, et al. Ubiquitin-Modified Proteome of SARS-CoV-2-Infected Host Cells Reveals Insights into Virus-Host Interaction and Pathogenesis. *J Proteome Res.* 2021;20:2224–39; <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.0C00758>
300. Boroujeni ME, Simani L, Bluysen HAR, et al. Inflammatory Response Leads to Neuronal Death in Human Post-Mortem Cerebral Cortex in Patients with COVID-19. *ACS Chem Neurosci.* 2021;12:2143–50; <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.1C00111>
301. Cusato J, Manca A, Palermi A, et al. COVID-19: A Possible Contribution of the MAPK Pathway. *Biomedicines.* 2023;11; <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11051459>
302. Dessie ZG, Zewotir T. Mortality-related risk factors of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of 42 studies and 423,117 patients. *BMC Infect Dis.* 2021;21; <https://doi.org/10.1186/S12879-021-06536-3>
303. Zeng Y, Liu J-X, Yan Z-P, et al. Potential microRNA biomarkers for acute ischemic stroke. *Int J Mol Med.* 2015;36:1639–47; <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2367>
304. Zeng Y, Liu JX, Yan ZP, et al. Potential microRNA biomarkers for acute ischemic stroke. *Int J Mol Med.* 2015;36:1639–47; <https://doi.org/10.3892/IJMM.2015.2367>
305. Wang Q, Zou Y, Xiao S, et al. miR-6124: A potential new prognosis biomarker for lung squamous cell carcinoma through m5C regulating mechanism. *J Clin Oncol.* 2022;40:e20568–e20568; https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_SUPPL.E20568

CAPÍTULO IX:
ANEXOS

Tabla Suplementaria S1. Comparación del perfil de citoquinas.

	INTUBATION OR DEATH(N = 40)	NON- INTUBATION OR DEATH(N = 68)	P-VALUE
BDNF	59.88 (108.75)	60.38 (184.53)	0.967
EGF	2.36 (4.37)	1.88 (8.49)	1.000
EOTAXIN	13.58 (8.54)	15.03 (10.22)	0.410
FGF2	1.07 (1.92)	0.80 (2.91)	0.879
GMCSF	11.26 (15.29)	13.09 (34.34)	0.397
GROA	2.82 (3.83)	3.48 (4.31)	0.346
HGF	294.75 (486.25)	139.25 (142.43)	<0.001
IFNA	0.45 (1.33)	0.58 (2.14)	0.712
IFNG	9.72 (11.17)	8.29 (6.84)	0.383
IL1A	3.37 (10.83)	1.81 (7.58)	0.127
IL1B	6.31 (10.72)	6.86 (10.09)	0.208
IL10	1.8 (2.85)	1.73 (2.02)	0.911
IL12P70	3.73 (2.62)	3.32 (3.25)	0.985
IL13	2.19 (2.55)	2.06 (3.46)	0.672
IL15	9.55 (19.65)	13.83 (17.47)	0.058
IL17A	6.35 (18.35)	7.32 (12.06)	0.303
IL18	58.98 (60.39)	40.28 (48.09)	0.160
IL1RA	644.67 (1312.68)	604.75 (961.67)	0.904
IL2	10.91 (17.42)	14.64 (20.59)	0.185
IL21	2.85 (7.97)	3.70 (13.81)	0.370
IL22	6.62 (46.36)	2.79 (20.08)	0.257
IL23	7.99 (7.58)	7.67 (10.50)	0.717
IL27	19.43 (26.49)	18.06 (44.09)	0.755
IL31	5.65 (6.44)	5.01 (8.85)	0.741
IL4	5.60 (4.95)	5.76 (7.88)	0.851
IL5	5.12 (36.16)	6.1 (16.84)	0.884
IL6	9.06 (28.74)	15 (20.69)	0.270
IL7	1.57 (3.01)	1.69 (3.01)	0.977
IL8	2.08 (4.61)	2.06 (3.57)	0.705
IL9	2.21 (2.81)	2.03 (4.35)	0.834
IP1B	53.33 (40.05)	45 (47.97)	0.794
IP10	48.78 (46.14)	43 (36.14)	0.390
LIF	13.48 (20.55)	15.70 (16.11)	0.997
MCP1	48.85 (62.81)	35.97 (28.01)	0.029
MIP1A	3.31 (12.61)	3.39 (10.98)	0.760
NGFB	4.36 (2.91)	4.08 (3.59)	0.975
PDGFBB	409.08 (1037.63)	203 (591.37)	0.042
PIGF1	27.22 (116.59)	4.24 (48.78)	0.036
RANTES	23.43 (17.75)	21.54 (19.79)	0.942
SCF	8.42 (9.50)	6.51 (5.98)	0.408
SDF1A	713.92 (742.29)	643 (500.75)	0.441
TNFA	7.56 (11.04)	5.85 (11.04)	0.736
TNFB	3.31 (3.58)	3.08 (5.33)	0.804
VEGFA	205.5 (250.56)	105.66 (162.2)	0.012
VEGFD	11.3 (13.23)	12.90 (13.34)	0.185

Las variables continuas son representadas [mediana (rango intercuartílico—IQR)].

Tabla Suplementaria S2. Modelo de regresión logística univariante para cada citoquina ajustada por edad y género

Cytokine	<i>p</i> -value	OR	CI 95%	
BDNF	0.910	0.988	0.808	1.210
EGF	0.841	0.984	0.838	1.155
Eotaxin	0.666	0.888	0.516	1.526
FGF2	0.882	0.987	0.828	1.176
GMCSF	0.336	0.894	0.711	1.124
GROa	0.410	0.888	0.669	1.178
HGF	0.000	2.121	1.468	3.062
IFNa	0.933	1.006	0.870	1.165
IFNg	0.303	1.230	0.830	1.822
IL1a	0.166	1.081	0.968	1.208
IL1b	0.117	0.789	0.586	1.061
IL10	0.947	1.013	0.696	1.474
IL12p70	0.887	1.035	0.639	1.677
IL13	0.608	0.941	0.746	1.187
IL15	0.026	0.696	0.506	0.958
IL17a	0.267	0.872	0.685	1.110
IL18	0.222	1.212	0.890	1.652
IL1RA	0.993	0.999	0.830	1.203
IL2	0.135	0.768	0.544	1.085
IL21	0.391	0.947	0.838	1.072
IL22	0.401	1.038	0.951	1.133
IL23	0.722	0.943	0.683	1.302
IL27	0.704	0.970	0.831	1.133
IL31	0.754	0.956	0.723	1.265
IL4	0.907	0.982	0.730	1.322
IL5	0.693	1.029	0.894	1.184
IL6	0.241	0.858	0.664	1.108
IL7	0.988	0.998	0.769	1.296
IL8	0.567	0.949	0.792	1.136
IL9	0.974	1.005	0.752	1.342
IP1b	0.733	0.946	0.688	1.301
IP10	0.713	1.064	0.766	1.477
LIF	0.909	1.019	0.739	1.405
MCP1	0.022	1.598	1.071	2.384
MIP1a	0.994	0.999	0.830	1.203
NGFb	0.582	1.150	0.699	1.890
PDGFBB	0.053	1.210	0.998	1.467
PIGF1	0.124	1.074	0.981	1.177
RANTES	0.478	1.154	0.777	1.713
SCF	0.452	1.148	0.801	1.645
SDF1a	0.686	1.040	0.861	1.256
TNFa	0.974	0.996	0.759	1.305
TNFb	0.979	1.004	0.716	1.409
VEGFA	0.123	1.180	0.956	1.456
VEGFD	0.113	0.739	0.508	1.075

OR—Odds Ratio; CI—Intervalo de confianza

Tabla Suplementaria S3. Modelo de regresión logística univariante para cada característica clínica ajustado por edad y género.

Clinical characteristics	p-value	OR	CI 95%	
Blood Group				
Grupo sanguíneo O	0.061	0.746	0.549	1.013
Comorbidities				
Fumador	0.622	1.428	0.347	5.880
Enfermedad coronaria	1.000	1.000	0.255	3.919
Fibrilación auricular	0.916	0.929	0.237	3.640
Diabetes	0.037	2.968	1.067	8.256
Enfermedad neurológica	0.773	1.512	0.091	25.173
Ictus	1.000	0.000	0.000	
Hipertensión	0.769	1.131	0.496	2.583
Hepatopatías	0.999	0.000	0.000	
Obesidad	0.023	5.363	1.254	22.936
EPOC	0.785	1.242	0.261	5.909
Nefropatías	0.360	3.151	0.270	36.797
Laboratory values				
Glucemia (mg/dL)	0.000	1.030	1.017	1.043
Creatinina (mg/dL)	0.122	1.633	0.877	3.041
Bilirrubina total (mg/dL)	0.250	1.449	0.770	2.725
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	0.000	1.000	1.000	1.000
Limfocitos (x10 ⁹ /L)	0.484	1.000	1.000	1.000
Neutrofilos (x10 ⁹ /L)	0.000	1.000	1.000	1.001
Procalcitonina (ng/ml)	0.048	2.527	1.010	6.327
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	0.932	1.000	1.000	1.000
PCR (mg/L)	0.091	1.004	0.999	1.008
Ferritina (µg/L)	0.002	1.001	1.000	1.001
Dímero D (mg/L)	0.050	1.000	1.000	1.000
LDH (mmol/L)	0.000	1.007	1.003	1.011

OR, Odds Ratio; CI, Intervalo de confianza

Tabla Suplementaria S4. Regresión logística multivariante por eliminación hacia atrás

	Effect	<i>p</i> -value	OR	CI 95%	
				Lower	Upper
Intubation or death	0 blood-group	0.019	0.073	0.008	0.654
	Glycaemia > 134.5 mg/dL	0.003	15.09	2.577	88.32
	Procalcitonin > 0.07 ng/mL	0.017	12.92	1.58	105.99
	Ferritin > 934 µg/L	0.039	6.91	1.1	43.5
	D-dimer > 1814.5 mg/L	0.041	13	1.11	152.04
	HGF > 187.5 pg/ml	0.025	7.38	1.28	42.4

CI— Intervalo de confianza; OR—Odds ratio.

Tabla Suplementaria S5. Reemuestreo con remplazo para las variables del modelo multivariante.

	B	Bias	Std. Error	<i>p</i>	95% CI	
					Lower	Upper
0 blood-group	-2.624	-10.322	22.637	0.031	-86.377	-0.265
Glycaemia>134.5 mg/dL	2.714	7.976	19.991	0.003	0.724	80.430
Procalcitonin>0.07 ng/mL	2.559	7.854	18.129	0.001	1.124	65.326
Ferritin>934 µg/L	1.933	3.788	12.909	0.013	0.496	52.612
D-dimer>1814.5 mg/L	2.566	10.785	21.444	0.008	0.109	79.985
HGF>187.5 pg/ml	1.998	6.852	16.286	0.003	0.536	61.567

CI—confidence Interval; B—beta coefficient.

Tabla Suplementaria S6: Comparación del perfil de citocinas en el primer día de ingreso hospitalario.

	Non-survival at 28 days (N=20)	Survivors (N=88)	p-value
BDNF	56.33 (77.63)	63 (179.78)	0.462
EGF	2.16 (10.52)	2.25 (7.55)	0.918
Eotaxin	13.65 (9.98)	14.28 (9.97)	0.629
FGF2	0.69 (1.86)	1.03 (2.63)	0.522
GMCSF	9.53 (7.56)	12.86 (31.34)	0.110
GROa	2.48 (4.19)	3.25 (4.24)	0.393
HGF	269.75 (636.25)	160.25 (208.48)	0.020
IFNa	0.44 (1.83)	0.51 (1.65)	0.931
IFNg	7.63 (11.83)	8.99 (6.67)	0.893
IL1a	7.52 (11.12)	1.83 (7.44)	0.040
IL1b	5.70 (5.85)	7.01 (10.62)	0.103
IL10	1.4 (2.54)	1.79 (2.56)	0.253
IL12p70	3.10 (2.43)	3.71 (3.21051825)	0.443
IL13	1.59 (1.55)	2.33 (3.1)	0.296
IL15	7.12 (17.09)	13.83 (19.10)	0.033
IL17a	3.87 (10.08)	7.36 (15.68)	0.054
IL18	58.98 (57.68)	45.58 (50.74)	0.319
IL1RA	627.42 (1358.75)	604.75 (992.85)	0.906
IL2	8.02 (10.85)	15.3 (21.01)	0.037
IL21	1.69 (6.18)	4.18 (13.04)	0.091
IL22	4.66 (46.68)	3.65 (20.56)	0.788
IL23	6.20 (6.64)	7.89 (9.84)	0.279
IL27	11.78 (20.91)	20.62 (38.20)	0.380
IL31	4.25 (6.3)	5.51 (8.45)	0.347
IL4	5.07 (4.85)	5.84 (7.43)	0.504
IL5	3.55 (6.10)	7.39 (20.88)	0.179
IL6	11.64 (30.23)	13.07 (21.79)	0.382
IL7	1.13 (2.64)	1.81 (3.03)	0.522
IL8	1.45 (4.66)	2.14 (3.57)	0.566
IL9	1.59 (2.23)	2.29 (3.97)	0.187
IP1b	43.68 (34.18)	49.78 (46.85)	0.506
IP10	48.78 (53.21)	45.4 (42.51)	0.710
LIF	11.26 (12.89)	16.15 (16.84)	0.329
MCP1	41.75 (71.28)	37.88 (30.85)	0.226
MIP1a	3.35 (11.01)	3.39 (11.96)	0.443
NGFb	3.61 (2.72)	4.37 (3.47)	0.275
PDGFBB	265 (564)	334.92 (718.3)	0.740
PIGF1	25.35 (162.61)	5.45 (49.81)	0.467
RANTES	23.43 (21.09)	22.15 (17.66)	0.731
SCF	9.06 (9.55)	6.46 (6.8)	0.319
SDF1a	649.25 (927.63)	669.5 (603)	0.943
TNFa	6.14 (7.579621)	6.13 (11.42)	0.424
TNFb	2.48 (2.93)	3.41 (4.92)	0.176
VEGFA	262.25 (277.38)	113.25 (164.49)	0.005
VEGFD	6.72 (18.10)	12.75 (12.86)	0.192

Continuous variables are represented as [median, (interquartile range, IQR)].

Tabla Suplementaria S7: Comparación del perfil de citocinas al tercer día de ingreso hospitalario

	Non-survival at 28 days (N=20)	Survivors (N=88)	p-value
BDNF	36.46 (54.84)	63.4 (201.05)	0.029
EGF	1.41 (2.24)	1.88 (4.25)	0.326
Eotaxin	9.78 (12.60)	14.2 (10.08)	0.046
FGF2	0.67 (1.29)	0.92 (2.21)	0.237
GMCSF	11.95 (16.28)	12.96 (28.17)	0.612
GROa	2.78 (6.15)	2.39 (2.25)	0.462
HGF	573.75 (616.5)	212 (286.5)	0.001
IFNa	0.20 (0.38)	0.29 (0.50)	0.322
IFNg	9.33 (12.46)	9.04 (5.82)	0.487
IL1a	2.96 (6.22)	2.27 (6.78)	0.804
IL1b	5.24 (5.50)	7.28 (9.1)	0.079
IL10	1.36 (2.57)	1.41 (1.33)	0.930
IL12p70	3.08 (1.82)	3.76 (2.98)	0.150
IL13	2.04 (2.11)	2.41 (3.29)	0.761
IL15	8.85 (11.65)	15.55 (13.63)	0.011
IL17a	5.15 (6.75)	7.61 (12.13)	0.063
IL18	66.35 (106.95)	41.8 (56.3)	0.030
IL1RA	552.25 (1501.86)	496 (951.5)	0.707
IL2	12.15 (13.2)	15.7 (17.66)	0.086
IL21	2.06 (5.73)	3.66 (11.66)	0.174
IL22	1.62 (20.56)	3.77 (14.17)	0.592
IL23	7.28 (8.06)	7.26 (8.16)	0.655
IL27	16.4 (24.47)	20.48 (48.56)	0.338
IL31	4.56 (5.13)	5.08 (7)	0.587
IL4	4.64 (4)	5.55 (5.84)	0.288
IL5	4.20 (9.90)	5.07 (21.07)	0.523
IL6	6.66 (33.77)	9.16 (18.39)	0.879
IL7	1.74 (1.9)	1.8 (2.36)	0.952
IL8	1.2 (1.85)	2.07 (5.59)	0.119
IL9	1.79 (2.3)	2.10 (3.12)	0.322
IP1b	44.08 (46.63)	50.4 (47.7)	0.448
IP10	29.5 (53.14)	24.75 (32.05)	0.265
LIF	9.92 (17.33)	13.35 (13.62)	0.592
MCP1	34.78 (37.54)	31.9 (33.55)	0.149
MIP1a	2.52 (10.44)	3.21 (9.08)	0.615
NGFb	3.88 (3.03)	4.22 (3.40)	0.930
PDGFBB	562 (752.85)	409.75 (1153)	0.777
PIGF1	21.51 (77.97)	4.76 (61.51)	0.968
RANTES	25.98 (34.07)	27.15 (23.6)	0.857
SCF	11.24 (22.20)	7.155 (5.44)	0.360
SDF1a	579.25 (960)	724.5 (651)	0.584
TNFa	5.73 (11.38)	7.07 (8.97)	0.549
TNFb	2.76 (3)	3.34 (3.96)	0.314
VEGFA	173.37 (375.5)	101.3 (160.85)	0.072
VEGFD	7.27 (9.22)	11.3 (11.18)	0.065

Continuous variables are represented as [median, (interquartile range, IQR)]

Tabla Suplementaria S8: Comparación del perfil de citocinas en el sexto día de ingreso hospitalario

	Non-survival at 28 days (N=20)	Survivors (N=88)	p-value
BDNF	33.45 (65.08)	49.75 (122.38)	0.094
EGF	1.49 (2.41)	1.766 (5.044)	0.661
Eotaxin	16.9 (11.53)	14.1 (10.48)	0.645
FGF2	0.58 (0.92)	0.78 (1.15)	0.451
GMCSF	8.18 (22.89)	11.94 (33.29)	0.157
GROa	1.8 (1.54)	2.21 (1.82)	0.491
HGF	1022 (1398.75)	265 (359.75)	0.000
IFNa	0.21 (0.37)	0.24 (0.31)	0.833
IFNg	7.73 (10.49)	8.87 (5.78)	0.782
IL1a	2.76 (14.11)	1.72 (6.35)	0.377
IL1b	4.51 (9.25)	6.5 (7.41)	0.090
IL10	1.28 (2.11)	1.42 (1.17)	0.961
IL12p70	2.97 (1.18)	3.53 (2.28)	0.157
IL13	1.65 (1.99)	2.08 (2.8)	0.199
IL15	8.51 (14.84)	14.8 (16.42)	0.035
IL17a	4.65 (8.42)	6.59 (11.07)	0.117
IL18	74.1 (60.48)	38.25 (48.9)	0.010
IL1RA	316 (1223.35)	473 (1072.49)	0.786
IL2	8.32 (11.31)	14.75 (21.77)	0.064
IL21	1.93 (5.6)	3.2 (7.7)	0.547
IL22	1.59 (15.97)	3.23 (11.63)	0.961
IL23	5.59 (4.55)	7.043 (6.31)	0.321
IL27	11.54 (24.65)	16.31 (45.45)	0.316
IL31	3.79 (3.56)	4.88 (4.53)	0.326
IL4	4.22 (2.15)	5.37 (4.94)	0.151
IL5	3.05 (4.47)	3.64 (8.45)	0.458
IL6	12.85 (28.88)	9.01 (19.18)	0.909
IL7	1.144 (2.30)	1.64 (2.52)	0.180
IL8	2.3 (11.46)	2.12 (9.85)	0.692
IL9	1.61 (1.68)	1.99 (2.12)	0.471
IP1b	39.75 (49.93)	39.85 (46.63)	0.645
IP10	16.8 (21.58)	17.3 (14.05)	0.745
LIF	10.39 (22.01)	10.47 (14.1)	0.676
MCP1	49.5 (29.13)	24.6 (34.38)	0.027
MIP1a	2.26 (8.26)	2.72 (8.22)	0.522
NGFb	3.65 (1.28)	3.85 (2.38)	0.505
PDGFBB	453.5 (881.45)	401.5 (1043.5)	0.633
PIGF1	59.05 (102.22)	7.5 (64.49)	0.395
RANTES	27.85 (17.73)	30.15 (19.3)	0.892
SCF	16.15 (21.03)	6.16 (7.33)	0.017
SDF1a	917.5 (1309.5)	571 (544)	0.125
TNFa	6.78 (8.96)	6.19 (9.90)	0.733
TNFb	2.52 (2.2)	3.02 (2.81)	0.445
VEGFA	250 (293.1)	82.15 (146.28)	0.017
VEGFD	9.59 (5.30)	12.47 (9.88)	0.170

Continuous variables are represented as [median, (interquartile range, IQR)]

Tabla Suplementaria S9: Prueba KMO y de Bartlett

Kaiser-Meyer-Olkin Measure of Sampling Adequacy.		0.697
Bartlett's Test of Sphericity	Approx. Chi-Square	1066.383
	Degrees of freedom	45
	Significance	<0.001

Tabla Suplementaria: Regresión logística hacia adelante de los componentes principales para todos los tiempos de muestreo

	B	Std. Error	Wald	<i>P-value</i>	OR	CI 95%	
						Low	High
PC3 day 0	-2.735	.600	20.789	0.029	2.35	1.09	5.06
PC1 day 6	.855	.391	4.790	0.003	0.273	0.12	0.64
PC2 day 6	-1.298	.436	8.853	0.001	5.24	2.03	13.48

CI, Intervalo de confianza; OR, Odds ratio

Figura Suplementaria 1. Análisis exploratorio. Se realizó un análisis multivariante mediante análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) a partir de datos de expresión de miRNA normalizados, correspondientes a los grupos de infección en exosomas (A) y plasma (B).

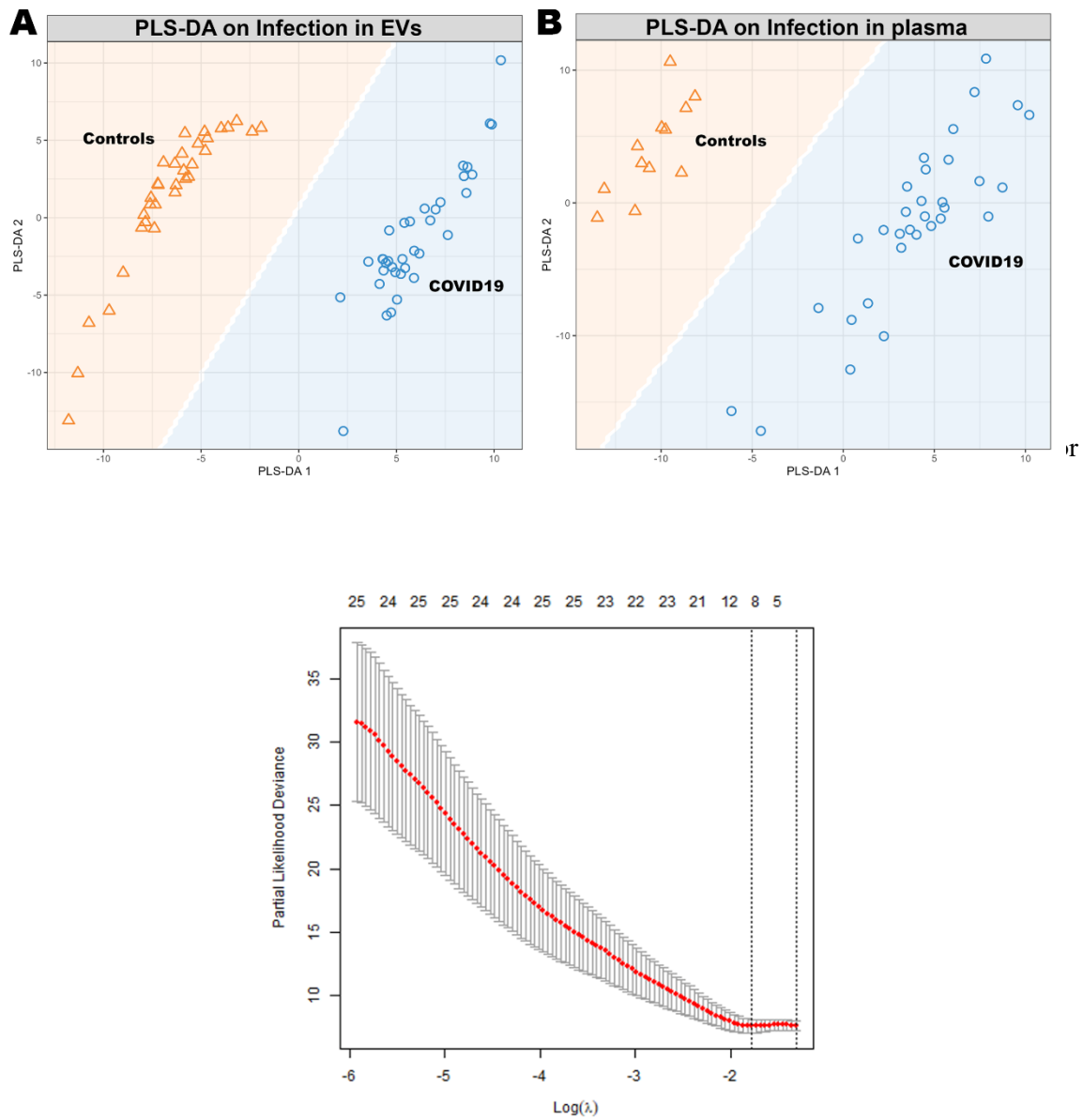


Tabla Suplementaria 11. miRNA SDE en EVs entre pacientes con COVID-19 severo y controles con $FC \geq 1.5$ y un $FDR \leq 0.05$.

	baseMean	log2FC	lfcSE	stat	pvalue	padj
hsa-miR-658	63.69	3.54	0.54	6.58	4.72E-11	2.29E-09
hsa-miR-4800-5p	11.63	3.10	0.58	5.35	8.88E-08	2.43E-06
hsa-miR-1249-5p	3.98	2.51	0.92	2.74	6.10E-03	4.30E-02
hsa-miR-2861	5.21	2.40	0.83	2.88	3.93E-03	2.97E-02
hsa-miR-7847-3p	22.06	2.06	0.42	4.86	1.17E-06	2.13E-05
hsa-miR-8085	2.84	2.01	0.69	2.93	3.42E-03	2.67E-02
hsa-miR-122-5p	251.11	1.91	0.30	6.36	1.97E-10	8.65E-09
hsa-miR-425-3p	2.72	1.73	0.58	3.00	2.67E-03	2.21E-02
hsa-miR-223-3p	491.90	1.71	0.23	7.40	1.39E-13	2.03E-11
hsa-miR-143-3p	141.78	1.46	0.21	6.87	6.54E-12	3.58E-10
hsa-miR-320c	18.32	1.44	0.30	4.77	1.81E-06	2.94E-05
hsa-miR-223-5p	4.04	1.42	0.53	2.69	7.06E-03	4.68E-02
hsa-miR-1246	15.93	1.38	0.43	3.23	1.22E-03	1.09E-02
hsa-miR-320b	36.29	1.24	0.26	4.79	1.68E-06	2.83E-05
hsa-miR-574-5p	116.19	1.08	0.32	3.39	6.96E-04	6.77E-03
hsa-miR-320d	10.46	1.04	0.36	2.91	3.58E-03	2.75E-02
hsa-miR-25-3p	116.64	1.03	0.15	7.06	1.65E-12	1.36E-10
hsa-miR-148a-3p	27.32	0.99	0.20	4.94	7.76E-07	1.55E-05
hsa-miR-7-5p	25.19	0.94	0.22	4.29	1.78E-05	2.37E-04
hsa-miR-484	50.77	0.93	0.19	5.00	5.62E-07	1.23E-05
hsa-miR-221-3p	59.15	0.92	0.18	5.23	1.69E-07	4.12E-06
hsa-miR-451a	2181.79	0.88	0.17	5.20	1.97E-07	4.54E-06
hsa-miR-363-3p	26.59	0.87	0.21	4.07	4.73E-05	5.92E-04
hsa-miR-875-5p	21.79	0.78	0.28	2.74	6.18E-03	4.30E-02

hsa-miR-425-5p	37.55	0.75	0.16	4.65	3.38E-06	4.85E-05
hsa-miR-22-3p	98.39	0.67	0.18	3.77	1.61E-04	1.77E-03
hsa-miR-486-5p	1071.59	0.64	0.13	4.72	2.37E-06	3.58E-05
hsa-miR-128-3p	23.14	0.63	0.22	2.93	3.42E-03	2.67E-02
hsa-miR-423-5p	250.80	0.60	0.10	5.89	3.82E-09	1.19E-07
hsa-miR-126-3p	762.84	-0.61	0.12	-4.97	6.56E-07	1.37E-05
hsa-miR-139-5p	65.46	-0.64	0.17	-3.78	1.56E-04	1.75E-03
hsa-miR-23a-3p	339.17	-0.66	0.11	-6.09	1.13E-09	3.81E-08
hsa-miR-10b-5p	333.35	-0.66	0.14	-4.82	1.47E-06	2.58E-05
hsa-miR-30a-5p	317.48	-0.69	0.10	-6.88	5.94E-12	3.58E-10
hsa-miR-150-5p	293.50	-0.69	0.13	-5.28	1.30E-07	3.36E-06
hsa-miR-27b-3p	191.63	-0.72	0.10	-7.20	5.92E-13	6.49E-11
hsa-miR-99b-5p	55.54	-0.74	0.16	-4.64	3.44E-06	4.85E-05
hsa-miR-23b-3p	68.75	-0.82	0.13	-6.27	3.50E-10	1.39E-08
hsa-miR-10a-5p	175.63	-0.83	0.14	-6.15	7.71E-10	2.81E-08
hsa-let-7e-5p	79.99	-0.99	0.14	-7.04	1.87E-12	1.36E-10
hsa-miR-126-5p	114.26	-1.04	0.14	-7.44	1.02E-13	2.03E-11
hsa-miR-181a-2-3p	5.56	-1.21	0.42	-2.86	4.29E-03	3.19E-02
hsa-miR-483-3p	3.89	-1.84	0.51	-3.58	3.41E-04	3.55E-03
hsa-miR-6775-5p	3.30	-2.25	0.69	-3.25	1.17E-03	1.09E-02
hsa-miR-149-3p	1.49	-2.42	0.90	-2.68	7.37E-03	4.82E-02
hsa-miR-6784-5p	2.16	-2.80	0.79	-3.55	3.79E-04	3.86E-03
hsa-miR-4754	1.04	-2.80	1.04	-2.70	7.00E-03	4.68E-02
hsa-miR-4505	1.33	-2.94	1.09	-2.71	6.75E-03	4.62E-02
hsa-miR-5705	1.46	-4.58	1.47	-3.11	1.86E-03	1.60E-02
hsa-miR-5192	1.26	-22.67	3.03	-7.49	6.90E-14	2.03E-11

Tabla Suplementaria S12. miRNA SDE en plasma entre pacientes con COVID-19 severo y controles con un $FC \geq 1.5$ y un $FDR \leq 0.05$.

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
hsa-miR-10400-5p	60.62	23.07	1.86	12.42	1.94E-35	1.28E-32
hsa-miR-5009-5p	2.80	19.10	2.46	7.77	7.75E-15	2.56E-12
hsa-miR-3135a	2.56	19.00	3.33	5.71	1.13E-08	7.44E-07
hsa-miR-6767-5p	90.51	9.03	2.68	3.37	7.52E-04	8.02E-03
hsa-miR-125a-3p	49.87	7.80	1.25	6.25	4.22E-10	4.65E-08
hsa-miR-937-3p	75.71	7.71	1.74	4.43	9.37E-06	2.38E-04
hsa-miR-4665-5p	76.73	7.16	1.31	5.47	4.42E-08	2.09E-06
hsa-miR-4661-5p	5.78	7.11	2.03	3.50	4.60E-04	5.15E-03
hsa-miR-7854-3p	104.79	7.01	0.97	7.19	6.25E-13	1.03E-10
hsa-miR-6721-5p	14.16	5.94	1.35	4.42	9.92E-06	2.43E-04
hsa-miR-548ae-5p	15.90	5.79	1.18	4.90	9.71E-07	3.06E-05
hsa-miR-6821-5p	46.16	5.76	1.55	3.71	2.06E-04	2.90E-03
hsa-miR-548ad-5p	15.86	5.49	1.12	4.90	9.53E-07	3.06E-05
hsa-miR-4646-5p	9.82	5.48	1.72	3.19	1.44E-03	1.36E-02
hsa-miR-331-3p	15.87	5.41	1.24	4.38	1.20E-05	2.73E-04
hsa-miR-8485	28.56	5.37	1.73	3.11	1.85E-03	1.57E-02
hsa-miR-4497	54.20	5.36	1.53	3.51	4.52E-04	5.15E-03
hsa-miR-5010-5p	11.38	5.28	1.28	4.12	3.82E-05	7.90E-04
hsa-miR-1273h-5p	46.21	5.21	1.12	4.65	3.26E-06	8.99E-05
hsa-miR-6873-3p	16.97	4.95	1.89	2.62	8.92E-03	4.99E-02
hsa-miR-4685-3p	12.06	4.85	1.67	2.90	3.79E-03	2.66E-02
hsa-miR-885-3p	17.08	4.82	1.46	3.30	9.51E-04	9.82E-03
hsa-miR-9-5p	6.20	4.80	1.78	2.70	6.90E-03	4.11E-02
hsa-miR-1284	10.03	4.77	1.52	3.15	1.66E-03	1.49E-02

hsa-miR-3173-5p	74.80	4.74	1.21	3.92	8.96E-05	1.60E-03
hsa-miR-1260b	119.13	4.68	0.91	5.15	2.62E-07	1.02E-05
hsa-miR-197-5p	8.96	4.67	1.59	2.94	3.32E-03	2.41E-02
hsa-miR-429	7.50	4.60	1.73	2.67	7.68E-03	4.53E-02
hsa-miR-3180-3p	26.06	4.60	1.50	3.06	2.19E-03	1.74E-02
hsa-miR-3180	26.06	4.60	1.50	3.06	2.19E-03	1.74E-02
hsa-let-7i-3p	9.90	4.52	1.54	2.94	3.30E-03	2.41E-02
hsa-miR-1306-5p	5.89	4.50	1.45	3.11	1.90E-03	1.57E-02
hsa-miR-548a-3p	5.82	4.43	1.67	2.65	8.13E-03	4.59E-02
hsa-miR-548e-3p	16.26	4.42	1.34	3.31	9.30E-04	9.76E-03
hsa-miR-455-5p	13.01	4.41	1.39	3.17	1.51E-03	1.40E-02
hsa-miR-10399-3p	56.07	4.37	0.90	4.87	1.10E-06	3.29E-05
hsa-miR-548ay-5p	16.29	4.34	1.09	3.97	7.12E-05	1.34E-03
hsa-miR-4659b-3p	6.64	4.14	1.49	2.77	5.55E-03	3.60E-02
hsa-miR-10527-5p	35.40	4.14	1.05	3.93	8.59E-05	1.58E-03
hsa-miR-4659a-3p	4.97	3.94	1.45	2.72	6.44E-03	3.94E-02
hsa-miR-148a-5p	162.08	3.92	0.94	4.18	2.92E-05	6.23E-04
hsa-miR-3605-5p	31.51	3.90	1.25	3.11	1.88E-03	1.57E-02
hsa-miR-99b-3p	69.66	3.76	1.01	3.71	2.06E-04	2.90E-03
hsa-miR-195-3p	21.11	3.46	1.11	3.11	1.87E-03	1.57E-02
hsa-miR-1287-5p	93.80	3.44	1.25	2.76	5.82E-03	3.70E-02
hsa-miR-320d	2660.27	3.41	0.55	6.21	5.27E-10	4.97E-08
hsa-miR-23a-5p	63.88	3.41	1.28	2.65	7.94E-03	4.58E-02
hsa-miR-5100	123.70	3.38	0.90	3.75	1.76E-04	2.72E-03
hsa-miR-151b	55.51	3.21	0.78	4.10	4.08E-05	8.01E-04
hsa-miR-4429	40.62	3.14	0.72	4.38	1.17E-05	2.73E-04
hsa-miR-320e	252.16	3.08	0.59	5.22	1.78E-07	7.36E-06

hsa-miR-320b	9960.47	3.08	0.56	5.54	2.98E-08	1.51E-06
hsa-miR-760	281.78	3.05	0.79	3.86	1.13E-04	1.97E-03
hsa-miR-766-5p	49.72	3.03	0.85	3.56	3.67E-04	4.47E-03
hsa-let-7f-2-3p	3.99	3.03	1.10	2.76	5.70E-03	3.66E-02
hsa-miR-3138	181.03	2.94	0.87	3.38	7.19E-04	7.79E-03
hsa-miR-320c	3962.84	2.92	0.57	5.13	2.86E-07	1.05E-05
hsa-miR-361-5p	31.77	2.75	0.84	3.29	1.00E-03	1.02E-02
hsa-miR-6734-5p	36.41	2.74	0.86	3.17	1.52E-03	1.40E-02
hsa-miR-193a-5p	2403.35	2.68	0.53	5.04	4.54E-07	1.58E-05
hsa-miR-320a-3p	78466.43	2.58	0.56	4.57	4.78E-06	1.26E-04
hsa-miR-134-5p	1019.33	2.55	0.74	3.44	5.92E-04	6.52E-03
hsa-miR-576-3p	372.65	2.50	0.66	3.80	1.44E-04	2.38E-03
hsa-miR-629-5p	2696.59	2.45	0.43	5.66	1.55E-08	8.52E-07
hsa-miR-4488	279.96	2.44	0.90	2.72	6.49E-03	3.94E-02
hsa-miR-200c-3p	69.25	2.39	0.74	3.22	1.30E-03	1.28E-02
hsa-miR-193b-5p	733.10	2.32	0.63	3.65	2.62E-04	3.46E-03
hsa-miR-151a-5p	349.58	2.31	0.81	2.83	4.60E-03	3.10E-02
hsa-miR-3960	472.29	2.28	0.82	2.79	5.25E-03	3.47E-02
hsa-miR-505-5p	59.85	2.27	0.63	3.61	3.03E-04	3.85E-03
hsa-miR-1908-5p	674.60	2.25	0.55	4.10	4.12E-05	8.01E-04
hsa-miR-502-3p	95.61	2.14	0.58	3.72	2.01E-04	2.90E-03
hsa-miR-1273h-3p	339.80	2.11	0.68	3.11	1.90E-03	1.57E-02
hsa-miR-22-3p	21126.40	1.98	0.26	7.67	1.72E-14	3.80E-12
hsa-miR-378c	272.46	1.96	0.67	2.94	3.24E-03	2.41E-02
hsa-miR-25-5p	122.74	1.90	0.65	2.93	3.43E-03	2.46E-02
hsa-miR-22-5p	429.88	1.82	0.48	3.82	1.32E-04	2.23E-03
hsa-miR-425-3p	201.30	1.79	0.59	3.03	2.41E-03	1.89E-02

hsa-miR-1290	455.40	1.68	0.54	3.10	1.92E-03	1.57E-02
hsa-miR-1246	865.07	1.59	0.43	3.67	2.47E-04	3.40E-03
hsa-miR-125b-5p	603.88	1.56	0.49	3.21	1.34E-03	1.30E-02
hsa-miR-501-3p	1338.84	1.54	0.44	3.53	4.13E-04	4.79E-03
hsa-miR-185-5p	4387.25	1.50	0.41	3.64	2.70E-04	3.50E-03
hsa-miR-423-5p	275575.49	1.37	0.37	3.74	1.81E-04	2.72E-03
hsa-miR-744-5p	3106.09	1.35	0.43	3.14	1.66E-03	1.49E-02
hsa-miR-92b-3p	305.60	1.35	0.47	2.87	4.06E-03	2.79E-02
hsa-miR-107	1062.03	1.32	0.37	3.54	4.08E-04	4.79E-03
hsa-miR-194-5p	1021.93	1.26	0.42	3.00	2.70E-03	2.05E-02
hsa-miR-99b-5p	2515.03	1.21	0.32	3.76	1.71E-04	2.72E-03
hsa-miR-221-3p	1497.74	1.08	0.38	2.82	4.81E-03	3.21E-02
hsa-miR-152-3p	560.45	1.08	0.41	2.65	7.96E-03	4.58E-02
hsa-miR-7-5p	1214.80	1.04	0.39	2.66	7.84E-03	4.58E-02
hsa-miR-486-5p	333207.86	0.95	0.34	2.77	5.54E-03	3.60E-02
hsa-miR-423-3p	13134.96	0.90	0.25	3.56	3.72E-04	4.47E-03
hsa-miR-103a-3p	1527.46	0.82	0.31	2.65	8.03E-03	4.58E-02
hsa-miR-363-3p	1893.75	0.67	0.25	2.73	6.35E-03	3.94E-02
hsa-miR-21-5p	46426.22	0.66	0.18	3.74	1.81E-04	2.72E-03
hsa-let-7g-5p	12900.27	-0.73	0.25	-2.91	3.64E-03	2.59E-02
hsa-miR-328-3p	1058.55	-1.01	0.32	-3.11	1.85E-03	1.57E-02
hsa-miR-139-5p	895.29	-1.10	0.34	-3.27	1.09E-03	1.09E-02
hsa-miR-215-5p	351.19	-1.54	0.42	-3.65	2.58E-04	3.46E-03
hsa-miR-155-5p	251.97	-1.55	0.57	-2.73	6.41E-03	3.94E-02
hsa-miR-340-3p	279.63	-1.71	0.59	-2.89	3.82E-03	2.66E-02
hsa-miR-150-3p	446.18	-1.99	0.67	-2.98	2.92E-03	2.19E-02
hsa-miR-146b-5p	11086.74	-1.99	0.29	-6.89	5.57E-12	7.37E-10

hsa-miR-4433b-3p	1361.23	-2.01	0.67	-3.03	2.45E-03	1.91E-02
hsa-miR-342-5p	3517.48	-2.50	0.43	-5.81	6.11E-09	4.49E-07
hsa-miR-3158-3p	1162.88	-2.75	0.47	-5.84	5.36E-09	4.43E-07
hsa-miR-150-5p	833.15	-3.09	0.55	-5.67	1.45E-08	8.52E-07
hsa-miR-642a-3p	32.16	-3.20	1.16	-2.75	5.98E-03	3.77E-02
hsa-miR-574-5p	590.24	-3.88	0.81	-4.80	1.59E-06	4.57E-05
hsa-miR-4433a-3p	14.06	-3.97	0.92	-4.30	1.69E-05	3.73E-04
hsa-miR-659-5p	13.74	-4.88	1.62	-3.01	2.57E-03	1.98E-02
hsa-miR-1275	111.88	-5.63	1.04	-5.39	7.03E-08	3.10E-06
hsa-miR-6806-3p	13.00	-6.15	2.16	-2.85	4.36E-03	2.97E-02
hsa-miR-3151-5p	10.32	-6.63	2.44	-2.71	6.64E-03	3.99E-02
hsa-miR-5193	7.81	-7.03	2.20	-3.20	1.36E-03	1.30E-02
hsa-miR-514a-3p	19.90	-7.09	1.99	-3.56	3.69E-04	4.47E-03

Figura Suplementaria 3. Diagrama de Venn de los miRNA SDE comunes en exosomas y plasma de pacientes COVID-19 severo.

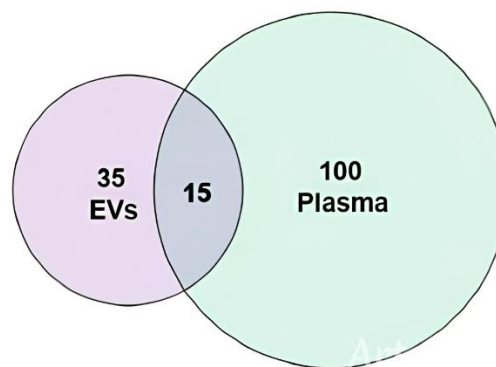


Tabla Suplementaria S13. Características de los pacientes con COVID-19 según la mortalidad a los 90 días.

	Alive	Deceased	p-value
No. of patients	24	12	
Age (years, Median (IQR))	81.5 (15.8)	75.5 (35)	0.724
Sex (males, N (%))	15 (62.5%)	6 (50.0%)	0.473
Comorbidities (N(%))			
Smoker	1 (4.2%)	1 (8.3%)	0.607
Alcoholism	0 (0.0%)	1 (8.3%)	0.151
Cardiopathy	7 (29.2%)	2 (16.7%)	0.414
Diabetes	5 (20.8%)	3 (25.0%)	0.777
Arterial hypertension	16 (66.7%)	6 (50.0%)	0.334
Obesity	3 (12.5%)	4 (33.3%)	0.137
Chronic Obstructive Pulmonary Disease	4 (16.7%)	1 (8.3%)	0.496
Asthma	1 (4.2%)	0 (0.0%)	0.473
Biochemistry (Median (IQR))			
Creatinine (mg/dl)	0.815 (0.37)	1.00 (0.43)	0.144
Leucocytes (n/μl)	9130 (5081)	11465 (5398)	0.97
Linfocytes (n/μl)	1.515 (564)	1310 (352)	0.623
Neutrophils (n/μl)	7425 (3318)	9755 (4311)	0.806
Platelets (n/μl)	182500 (158500)	204500 (54250)	0.985
Triglycerids (mg/dl)	115 (71.5)	165.5 (106.5)	0.302
Cholesterol (mg/dl)	139.5 (32.2)	150.5 (39.3)	0.533
Glucose (mg/dl)	129.5 (76)	90 (62)	0.113
Bilirubin (mg/dl)	0.5 (0.45)	0.5 (0.23)	0.506
Hospitalization variables			
Temperature (Median (IQR))	36.7 (0.8)	36.7 (1.6)	0.848
Length of hospitalary stay (Median (IQR))	9.5 (14)	9.5 (51.5)	0.762
Therapy (N (%))			
Thyroid hormones	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-
Statins	6 (25.0%)	1 (8.3%)	0.234
Betablockers	1 (4.2%)	0 (0.0%)	0.473
Immunosupressants	0 (0.0%)	0 (0.0%)	-

Tabla Suplementaria S14. Valores de AUC para los mejores predictores seleccionados de la lista de miRNAs identificados mediante **LASSO-Cox**.

miRNA	AUC
miR-1469	0.910
miR-1469 (age + gender adjusted)	0.880
miR-6124	0.880
miR-6124 (age + gender adjusted)	0.810
Combined miRNAs (miR-1469 + miR-6124)	0.810
Combined miRNAs (age + gender adjusted)	0.940

