



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
FACULTAD DE FARMACIA**

**EVALUACIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS  
Y SU ASOCIACIÓN CON SECUELAS  
PULMONARES EN PACIENTES POST COVID-19  
POR SERGIO ANDRÉS SANHUEZA NOVOA**

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia para optar al título de  
Magister en Bioquímica Clínica e Inmunología

**Profesor guía y patrocinante**

Dr. Estefanía Andrea Nova Lamperti  
Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

**29 de Marzo 2023**

**Concepción, Chile.**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2023, Sergio Andrés Sanhueza Novoa.

## TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
INDICE DE TABLAS .....	viii
RESUMEN.....	x
1. INTRODUCCIÓN .....	11
<b>1.1.- Reconocimiento del virus SARS-CoV-2 y sus características patológicas.</b> .....	11
<b>1.2.- Tormenta de citoquinas y progresión en la gravedad de la COVID-19     durante su etapa aguda.</b> .....	17
<b>1.3.- Desregulación del perfil inmunológico de pacientes infectados.</b> .....	24
<b>1.4.- Estado pulmonar durante la fase aguda de la COVID-19.</b> .....	29
<b>1.5.- Características de pacientes post COVID-19.</b> .....	35
2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	42
3. HIPÓTESIS.....	43
4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
<b>5.1.- Recopilación de muestras.</b> .....	46
<b>5.2.- Recopilación de parámetros clínicos.</b> .....	47
<b>5.3.- Obtención de la evaluación del daño estructural del pulmón mediante     Tomografías computarizadas de tórax.</b> .....	48
<b>5.4.- Obtención de la evaluación del daño en la funcionalidad pulmonar     mediante DLCO.</b> .....	49
<b>5.5.- Evaluación física mediante test de espirometría, TM6M y HGS.</b> .....	50
<b>5.6.- Cuantificación de quimioquinas y citoquinas.</b> .....	52
<b>5.6.- Análisis estadístico.</b> .....	55
<b>5.7.- Análisis proteómico de muestras agudas y 4 meses post infección.</b> .....	58
<b>5.7.1.- Depleción de proteína sérica.</b> .....	58
<b>5.7.2.- Extracción y digestión de proteínas para nLC-MS/MS.</b> .....	59
<b>5.7.3.- Fraccionamiento de péptidos y construcción de biblioteca.</b> .....	60
<b>5.7.4.- Espectrómetro de masas TIMS-TOF Pro.</b> .....	61

5.7.5.- Búsqueda en base de datos y biblioteca espectral.....	62
5.7.6.- Análisis bioinformático. ....	63
6. RESULTADOS.....	64
6.1) Análisis de data obtenida en reclutamiento 1.....	64
6.1.1) Clasificación de pacientes según sus secuelas pulmonares.....	66
6.1.2) Evaluación de la condición física.....	75
6.1.3) Análisis de datos demográficos.....	80
6.1.4) Análisis de recuento celular. ....	89
6.2) Análisis de data obtenida en reclutamiento 2.....	92
6.2.1) Repetición de test DLCO.....	92
6.2.2) Repetición de evaluación de la condición física. ....	95
6.3) Cuantificación de citoquinas.....	99
6.3.1) Cuantificación de citoquinas del periodo activo de la COVID-19.....	100
6.3.2) Cuantificación de citoquinas 4 meses post COVID-19.....	107
6.3.3) Cuantificación de citoquinas 12 meses post COVID-19.....	109
6.3) Comparación de citoquinas con secuelas pulmonares post COVID-19....	111
6.3.1) Secuela pulmonar y citoquinas pertenecientes a la etapa activa. ....	111
6.3.2) Secuela pulmonar y citoquinas pertenecientes al reclutamiento 1. ...	113
6.3.3) Secuela pulmonar y citoquinas pertenecientes al reclutamiento 2. ...	119
6.4) Proteómica. ....	122
6.4.1) Obtención de muestras para análisis de proteoma. ....	122
6.4.2) Análisis del proteoma sérico. ....	125
7. DISCUSIÓN.....	136
8. CONCLUSIÓN .....	150
9. BIBLIOGRAFÍA .....	151
10. ANEXO-1 .....	158
<b>Figuras complementarias.</b> .....	158
11. ANEXO-2 .....	160
<b>Características del grupo en estudio.</b> .....	160
12. ANEXO-3 .....	161
<b>Consentimiento comité ético científico del servicio de salud BIOBIO.</b> .....	161
<b>Consentimiento Comité Ética, Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción.</b> ....	163
13. ANEXO-4 .....	166

<b>Manejo de residuos.....</b>	<b>166</b>
--------------------------------	------------

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. Tomografía computarizada de tórax</b> .....	14
<b>FIGURA 2. Esquema explicativo de la respuesta de células epiteliales alveolares frente al virus SARS-CoV-2.</b> .....	18
<b>FIGURA 3. Cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-<math>\alpha</math> e IFN-<math>\gamma</math> al momento del diagnóstico de COVID-19.</b> .....	21
<b>FIGURA 4. Cuantificación de IL-1<math>\beta</math>, IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF relacionada con la gravedad de la COVID-19.</b> .....	23
<b>FIGURA 5. Seguimiento a los marcadores de agotamiento de células T.</b> .....	27
<b>FIGURA 6. Cuantificación total de células T, células T CD-4<sup>+</sup> y células T CD-8<sup>+</sup> por parte de dos estudios diferentes.</b> .....	28
<b>FIGURA 7. Caracterización de opacidades pulmonares en TCT generadas durante la COVID-19.</b> .....	30
<b>FIGURA 8. TCT representativa de grupo de pacientes dados de alta.</b> .....	33
<b>FIGURA 9. TCT representativa de grupo de pacientes fallecidos.</b> .....	34
<b>FIGURA 10. Cuantificación de citoquinas post COVID-19.</b> .....	37
<b>FIGURA 11. TCT del seguimiento de la condición pulmonar en paciente post COVID-19.</b> .....	39
<b>FIGURA 12. Cuantificación de citoquinas y quimioquinas en base a su relación con el estado pulmonar 4 meses post COVID-19.</b> .....	41
<b>FIGURA 13. Esquema del trabajo estadístico según los diferentes parámetros comparables.</b> .....	57
<b>FIGURA 14. Línea de tiempo de trabajo.</b> .....	65
<b>FIGURA 15. Clasificación de secuelas según exámenes respiratorios pertenecientes al reclutamiento 1.</b> .....	68
<b>FIGURA 16. Análisis del resultado final de las TCT y el test DLCO.</b> .....	70
<b>FIGURA 17. Distribución del grupo en estudio según severidad y desarrollo de SARS durante la etapa activa de COVID-19.</b> .....	74
<b>FIGURA 18. Parámetros evaluados de la espirometría a los 4 meses con respecto a la categorización del grupo en estudio.</b> .....	77
<b>FIGURA 19. Evaluación del TM6M, HGS, SpO<sub>2</sub> y escala de fatiga a los 4 meses con respecto a la categorización del grupo en estudio.</b> .....	79
<b>FIGURA 20. Diferencias entre las edades promedios del grupo en estudio.</b> .....	84
<b>FIGURA 21. CHCM, conteo plaquetario, conteo linfocitario y hemoglobina evaluados según la categorización del grupo en estudio.</b> .....	91
<b>FIGURA 22. Repetición de test DLCO en el grupo con DPLP.</b> .....	94
<b>FIGURA 23. Parámetros evaluados de la espirometría a los 12 meses con respecto a la categorización del grupo en estudio.</b> .....	96

<b>FIGURA 24. Evaluación del TM6M, HGS y SpO<sub>2</sub> a los 12 meses con respecto a la categorización del grupo en estudio.</b> .....	98
<b>FIGURA 25. Comparación de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 entre etapa activa y de recuperación.</b> .....	102
<b>FIGURA 26. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 entre la etapa activa y de recuperación.</b> .....	104
<b>FIGURA 27. Comparación de los niveles de IL-12, TNF, IL-1<math>\beta</math> y CCL-2 entre la etapa activa y de recuperación.</b> .....	106
<b>FIGURA 28. Cuantificación de citoquinas pertenecientes al reclutamiento 1.</b> .....	108
<b>FIGURA 29. Cuantificación de citoquinas pertenecientes al reclutamiento 2.</b> .....	110
<b>FIGURA 30. Comparación de los niveles de citoquinas en etapa activa según la categorización de pacientes.</b> .....	112
<b>FIGURA 31. Comparación de los niveles de citoquinas en reclutamiento 1 según la categorización de pacientes.</b> .....	114
<b>FIGURA 32. Comparación de la cuantificación de citoquinas (reclutamiento 1) entre el grupo con DPLP y el grupo normal.</b> .....	116
<b>FIGURA 33. Correlación de CXCL-10, CXCL-9 e IL-6 durante reclutamiento 1.</b> ...	118
<b>FIGURA 34. Comparación de los niveles de citoquinas en reclutamiento 2 según la categorización de pacientes.</b> .....	120
<b>FIGURA 35, Comparación de la cuantificación de citoquinas (reclutamiento 2) entre el grupo con DPLP y el grupo normal.</b> .....	121
<b>FIGURA 36. Resumen de procedencia de muestras de suero para análisis proteómico.</b> .....	124
<b>FIGURA 37. Análisis de componentes principales.</b> .....	126
<b>FIGURA 38. Análisis de datos mediante mapa de calor e IPA.</b> .....	128
<b>FIGURA 39. Vías diferencialmente activas en pacientes con DPLP.</b> .....	131
<b>FIGURA 40. Resumen gráfico de vías activas o inhibidas por condición.</b> .....	133
<b>FIGURA 41. Red de mayor efecto regulatorio por condición durante T0.</b> .....	135
<b>FIGURA 42. Figura complementaria 1.</b> .....	158

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1. Distribución de diluciones estándar en los tubos control.....</b>	<b>54</b>
<b>TABLA 2. Características del grupo en estudio durante la etapa activa de la COVID-19.....</b>	<b>72</b>
<b>TABLA 3. Tabla de contingencia del grupo en estudio según sus secuelas pulmonares, edad promedio y sexo. ....</b>	<b>82</b>
<b>TABLA 4. Tabla de contingencia del grupo sanguíneo ABO según la categorización del grupo en estudio por sus secuelas pulmonares. ....</b>	<b>86</b>
<b>TABLA 5. Comorbilidades previas a COVID-19 en el grupo en estudio dividido según sus secuelas pulmonares. ....</b>	<b>88</b>
<b>TABLA 6. Parámetros del hemograma comparados entre los participantes divididos por sus secuelas pulmonares.....</b>	<b>90</b>

## ABSTRACT

Severe COVID-19 is characterized by marked cytokine release and pulmonary dysfunction; however, it is still unknown which mediators support post-COVID-19 pulmonary dysfunction. Our aim was to determine the signaling pathways associated with long-term pulmonary dysfunction in patients with COVID-19. Our cohort of 60 patients with COVID-19 were followed up at 4- and 12-months post infection. Pulmonary sequelae were analyzed by computed tomography (CT), diffusing capacity of carbon monoxide (DLCO), spirometry, 6-minute walk test (6MWT) and handgrip test (HGS). Cytokines, chemokines and blood tests parameters were also analyzed. Furthermore, signaling pathways associated with pulmonary dysfunction were identified by serum proteomics analysis using TimsTOF-Pro and ingenuity pathway analysis. Fourteen patients with CT and abnormal DLCO were classified as patients with long-term pulmonary dysfunction (LTPD), who also presented impaired spirometry tests, 6MWT and HGS than patients without sequelae or patients with CT only. We observed that only CXCL-9 was significantly increased in LTPD patients in comparison with other groups. In addition, the main signaling pathways identified by proteomics in LTPD patients were associated with an immunothrombotic state related to cardiac dysfunction, migration of dysfunctional monocytes and reduced IFN- $\gamma$  signaling. In summary, patients with LTPD presented a restrictive lung condition, with greater fatigue, lower aerobic capacity and muscle strength 4-months post-COVID-19. Our data suggest that patients with previous cardiac dysfunction who had severe or moderate COVID-19 are more susceptible to develop LTPD.

## RESUMEN

La COVID-19 grave se caracteriza por una marcada liberación de citoquinas y disfunción pulmonar; sin embargo, aún se desconoce qué mediadores sustentan la disfunción pulmonar posterior a la COVID-19. Nuestro objetivo fue determinar las vías de señalización asociadas con la disfunción pulmonar a largo plazo en pacientes con COVID-19. Nuestra cohorte de 60 pacientes con COVID-19 fue seguida a los 4 y 12 meses posteriores a la infección. Las secuelas pulmonares se analizaron mediante tomografía computarizada (TC), capacidad de difusión de monóxido de carbono pulmonar (DLCO), espirometría, prueba de caminata de 6 minutos (6MWT) y prueba de agarre manual (HGS). También se analizaron citoquinas, quimioquinas y parámetros de análisis sanguíneo. Además, las vías de señalización asociadas con la disfunción pulmonar se identificaron mediante análisis de proteómica sérica utilizando TimsTOF-Pro y análisis de vías de ingenio. Catorce pacientes con TC y DLCO anormal fueron clasificados como pacientes con disfunción pulmonar a largo plazo (DPLP), quienes además presentaban un mayor número de alteraciones en las pruebas de espirometría, 6MWT y HGS frente a los pacientes sin secuelas o pacientes con solo TC anormal. Observamos que solo CXCL-9 aumentó significativamente en pacientes con DPLP en comparación con otros grupos. Además, las principales vías de señalización identificadas por proteómica en pacientes con DPLP se asociaron con un estado inmunotrombótico relacionado con disfunción cardíaca, migración de monocitos disfuncionales y señalización reducida de IFN- $\gamma$ . En resumen, los pacientes con DPLP presentaron una condición pulmonar restrictiva, con mayor fatiga, menor capacidad aeróbica y fuerza muscular 4 meses post-COVID-19. Nuestros datos sugieren que los pacientes con disfunción cardíaca previa y que presentaron COVID-19 grave o moderado son más susceptibles de desarrollar DPLP.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1.- Reconocimiento del virus SARS-CoV-2 y sus características patológicas.

El 31 de diciembre del año 2019 la comisión de Salud Municipal de Wuhan, China, notificó a la Organización Mundial de la Salud (OMS) la existencia de un brote de neumonía de etiología desconocida (Wu & McGoogan, 2020). Diez días después aproximadamente se determinó mediante análisis genético, que el causante de estas complicaciones respiratorias es un virus, perteneciente a la familia de los beta coronavirus. A fines del mes de enero de 2020 se informó que posiblemente su origen sea de carácter zoonótico, proveniente de los mercados que comercian comida y animales en la ciudad de Wuhan (Wu et al., 2020). El virus posteriormente alcanzó características pandémicas, diseminándose por el mundo con una alta tasa de transmisibilidad, alcanzando actualmente más de quinientas millones de personas infectadas y casi siete millones de personas fallecidas (Información extraída de Universidad Johns Hopkins, Baltimore, EE.UU.), superando con creces las cifras alcanzadas por la última pandemia vivida entre los años 2009 y 2010 causada por el virus H1N1/09 con cerca de un millón setecientas mil personas infectadas y casi veinte mil fallecidos (WHO Situation update, 2009).

El patógeno infeccioso fue denominado coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV-2), puesto que presenta una alta homología genética con dos virus, el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) del año 2002 y el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) del año 2012, siendo ambos altamente patógenos con origen zoonótico (Corman et al., 2018; Cui et al., 2019). El SARS-CoV-2 comparte un 79% de la secuencia genómica del SARS-CoV y un 50% de la secuencia genómica del MERS-CoV (Lu et al., 2020). Presenta una nucleocápside de ARN y glicoproteínas ancladas a su envoltura que le permiten interactuar con su receptor funcional e infectar las células de su organismo huésped (Hu et al., 2021).

Las personas que son infectadas por el virus desarrollan una patología capaz de progresar en gravedad desde un estado leve, moderado a severo, la cual recibió el nombre de enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19) y se caracteriza por presentar en su etapa crítica de gravedad un síndrome respiratorio agudo severo (SARS), siendo éste último el responsable de generar los principales problemas al tratamiento médico de la enfermedad al obstruir con una marcada inflamación las vías respiratorias (Xu et al., 2020). La neumonía severa que se genera en este estado de la enfermedad produce focos de daño a nivel pulmonar, tales como, opacidades en vidrio esmerilado, focos de consolidación y bronquiectasias, entre otras, siendo posible su observación mediante las

tomografías computarizadas de tórax (TCT) (**Figura 1**) (Sánchez-Oro et al., 2020).



**FIGURA 1. Tomografía computarizada de tórax**

Tomografía computarizada de tórax de un paciente de 60 años que padece COVID-19. La imagen destaca opacidades periféricas en vidrio esmerilado en el hemitórax (flechas discontinuas), focos de consolidación en la llingula (flecha negra) y bronquiectasias (flecha blanca). (Extraído de Sánchez *et al.*, 2020).

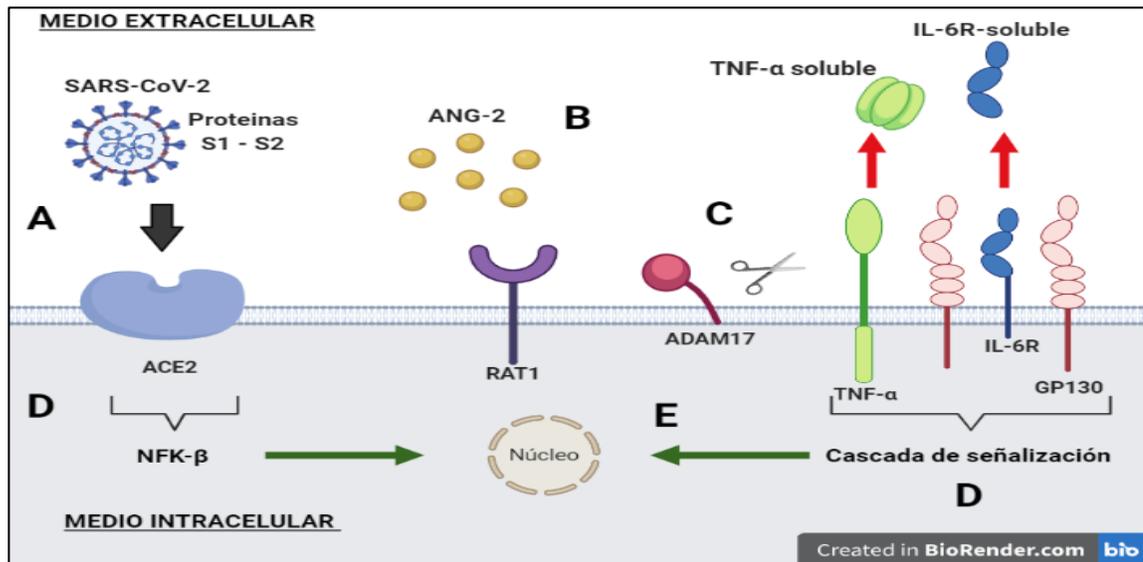
Estas injurias pulmonares son provocadas por un conjunto de factores, agravando el estado de los pacientes críticos hasta llegar a la muerte o provocando secuelas en el tejido pulmonar de los pacientes que logran recuperarse (Liang et al., 2020).

Los síntomas de esta enfermedad se presentan por lo regular dentro de los primeros 5 días posterior a la infección viral, aunque también pueden existir casos asintomáticos, los cuales, al igual que los pacientes sintomáticos, pueden poseer la capacidad de transmitir el virus a personas sanas mediante un contacto estrecho (Bai et al., 2020; Jain et al., 2020). La sintomatología de la enfermedad es variada, siendo los síntomas más clásicos la fiebre, la tos seca y la fatiga, sin embargo también existen casos que presentan mayor diversidad en la sintomatología como presencia del dolor de cabeza, diarrea, dolor de garganta, dolor de tórax, pérdida del olfato y el gusto (Pan et al., 2020). Por otra parte, la disnea y neumonía se presenta alrededor de 8 días después del inicio de los síntomas, siendo éste un claro indicio de que la enfermedad comienza a progresar en gravedad pudiendo desarrollar el SARS con el paso de los días (Wu & McGoogan, 2020). Toda esta sintomatología y la enfermedad en general puede tener un aumento significativo en cuanto a la gravedad de la progresión a su etapa crítica cuando los pacientes afectados son mayores de 60 años y/o padecen patologías de base como diabetes, hipertensión y complicaciones respiratorias (Dolan et al., 2020).

Así, como queda ejemplificado en un reporte de 72.314 casos, realizado por el centro Chino para el Control y la Prevención de Enfermedades, el cual está compuesto por 44.672 casos confirmados por pruebas moleculares (62%), 16.186 casos sospechosos por la sintomatología del paciente (22%), 10.567 casos diagnosticados por imagenología pulmonar y síntomas (15%) y 889 casos asintomáticos con un resultado positivo en las pruebas moleculares (1%). De los casos confirmados, un 87% se encuentra en el rango etario de entre los 30 a 79 años. La enfermedad, en los casos confirmados, se manifestó como leve en un 81%, grave (internado en UCI y con ayuda mecánica para la respiración producto del SARS) en un 15% y crítica (peligro inminente de perder la vida) en un 5%, alcanzando así una tasa de letalidad del 2,3%, con un 49% de los casos críticos fallecidos (Wu & McGoogan, 2020).

## **1.2.- Tormenta de citoquinas y progresión en la gravedad de la COVID-19 durante su etapa aguda.**

De esta manera, es que el gran problema de la infección viral se ve representado por el desarrollo del SARS, el cual se caracteriza por obstruir las vías respiratorias del paciente mediante un proceso inflamatorio exacerbado (Xu et al., 2020). Esta inflamación, en sí, es producida por una descontrolada liberación de citoquinas, lo que es conocido en el contexto de la infección por SARS-CoV-2 como tormenta de citoquinas o síndrome liberador de citoquinas (SLC). El síndrome comienza *per se* al momento en que la proteína viral *spike* (S), ubicada en la membrana del virus y con una longitud completa de 1273 residuos de aminoácidos, hace contacto con su receptor funcional la enzima convertidora de angiotensinas 2 (ECA-2) en las células epiteliales alveolares del pulmón (J. Zhang et al., 2021). Una vez allí, se comienza a genera una respuesta tanto a nivel extra-celular como intra-celular (**Figura 2**), desencadenando un aumento exacerbado de diversas citoquinas (Dayarathna et al., 2020; Hong et al., 2020).

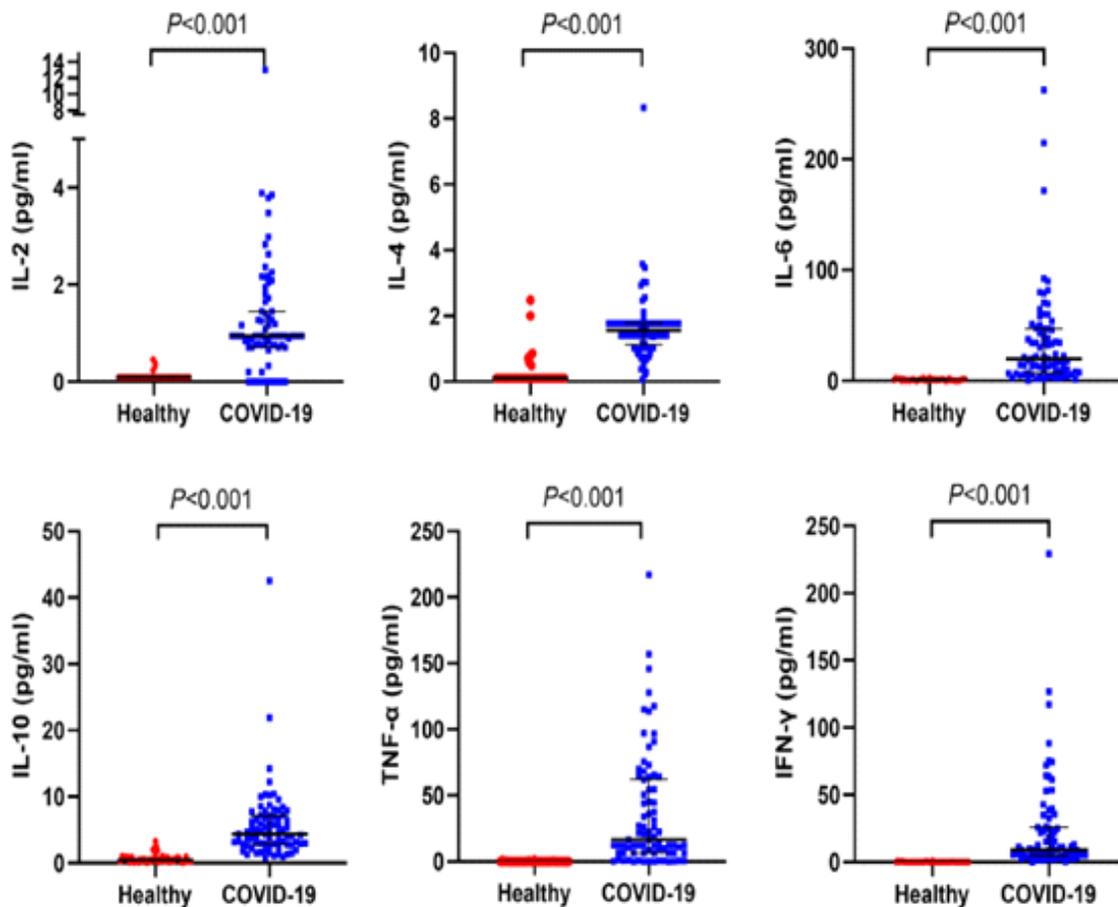


**FIGURA 2. Esquema explicativo de la respuesta de células epiteliales alveolares frente al virus SARS-CoV-2.**

**A)** Interacción de la proteína S viral con el receptor ACE-2 en la membrana de células epiteliales alveolares (flecha negra). **B)** Al ser utilizados los receptores ACE-2 por el virus, se comienza a acumular angiotensina 2 a nivel extra celular, proteína que es el ligando natural de ACE-2. **C)** La célula censa la acumulación de angiotensina 2 y genera la activación de la proteasa ADAM-17, la cual actúa liberando proteínas de membrana mediante procesamiento proteolítico (flechas rojas), lo que sirve como comunicación celular y activación de la respuesta inmune. **D)** Intracelularmente, la célula genera respuestas frente a la invasión viral activando cascadas de señalización mediadas principalmente por NFK- $\beta$ , como también se activan cascadas de señalización por la comunicación celular mediante la interacción de proteínas inflamatorias circulantes, como IL-6 o TNF- $\alpha$ , y sus respectivos receptores de membrana. **E)** Las cascadas de señalización activadas tienen la capacidad de generar una respuesta con la facultad de translocarse a nivel nuclear (flechas verdes) e inducir la traducción de proteínas inflamatorias.

El contacto virus-receptor es capitalizado por la proteína S, la que se divide en dos partes funcionalmente distintas (S1 y S2). S1 contiene el dominio de unión al receptor (RBD), el que hace contacto con el receptor celular del huésped. Por otra parte, S2 contiene regiones de repetición heptada y el péptido de fusión, encargándose de la fusión de las membranas viral y celular. Estas glicoproteínas necesitan de un procesamiento proteolítico para activar la endocitosis del virus, lo cual es ayudado por proteasas del huésped, como la proteasa serina 2 transmembrana (TMPRSS2), catepsina L y furina (Hoffmann et al., 2020; Walls et al., 2020). De esta forma es que extracelularmente, se comienza a acumular angiotensina 2 producto de la utilización de su sitio de unión en la ECA-2 por parte de la partícula viral. Esto es censado por la célula, activando la proteasa ADAM-17 que se encargará mediante procesos proteolíticos de clivar ciertas proteínas que se encuentran ancladas a la membrana de la célula, como TNF- $\alpha$  y receptores de citoquinas, para así liberarlas al medio y actuar como señales de comunicación, poniendo en alerta al resto de las células y al sistema inmune. Por otra parte, dentro de la célula infectada, se activan factores inflamatorios como la activación de la señalización mediada por NFK- $\beta$ , que, en conjunto con las señales citoquímicas proporcionadas por las células vecinas, translocan señales inflamatorias al núcleo y se comienzan a traducir y secretar proteínas inflamatorias, principalmente citoquinas (**Figura 2**) (Hoffmann et al., 2020; Letko et al., 2020; Shang et al., 2020; Walls et al., 2020)

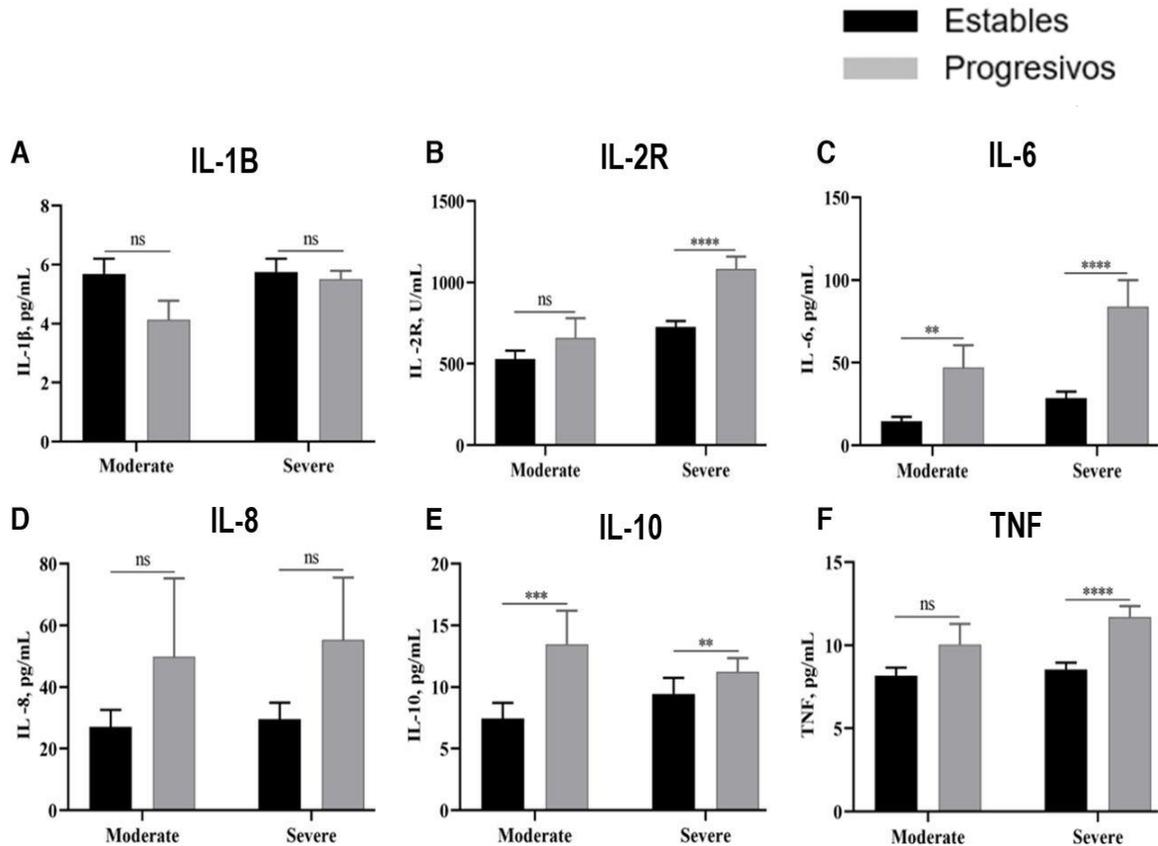
En un estudio realizado por Song y colaboradores, utilizando datos de la Universidad de Zhejiang, China, se pudieron obtener los niveles de citoquinas de 79 pacientes inmediatamente después del ingreso hospitalario al ser diagnosticados con COVID-19, los que fueron comparados con los niveles de citoquinas de 37 personas sanas. El estudio describió que Interleuquinas (IL) – 2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (**Figura 3**) se encontraron significativamente elevadas en los pacientes infectados en comparación a las personas sanas. Además, estos pacientes confirmados con la patología, posteriormente desarrollaron la COVID-19 con diferentes niveles de gravedad. De ellos, 48 pacientes fueron catalogados como graves y 31 pacientes leves (Song et al., 2020).



**FIGURA 3. Cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  al momento del diagnóstico de COVID-19.**

Datos de 37 personas sanas y 79 pacientes confirmados con la enfermedad, obtenidos a partir del sistema de registros médicos electrónicos del Primer Hospital Afiliado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zhejiang, China (Extraído de Song *et al.*, 2020).

La progresión de la gravedad de la COVID-19 está ligada directamente con el estado inflamatorio sistémico que sufren los pacientes, siendo la señalización mediada por citoquinas un marcador fundamental para tal relación. Así quedó demostrado en un estudio de cohorte retrospectivo realizado en China por Liu y colaboradores, donde se registraron los valores de citoquinas circulantes a partir de muestras sanguíneas en 308 pacientes posterior a su hospitalización por COVID-19. En el presente estudio se describió que los valores de IL-6, IL-8, IL-10, receptor de IL-2 (IL-2R) y TNF- $\alpha$  se encontraban elevados al inicio del estudio en pacientes que evolucionaron progresivamente hacia una condición de mayor gravedad de la COVID-19, en comparación con pacientes con valores mas bajos de citoquinas y cuya enfermedad no fue progresando en gravedad durante el tiempo (**Figura 4**). Al final del estudio 138 pacientes fallecieron y 170 pacientes se recuperaron. Estas citoquinas terminaron por ser 2 a 20 veces mayores en los pacientes que fallecieron en comparación con los pacientes que se recuperaron, concluyendo que los niveles iniciales de citoquinas se asocian con la progresión de la COVID-19 y ayudan a distinguir a los pacientes críticos de los menos afectados (Liu et al., 2020).



**FIGURA 4. Cuantificación de IL-1 $\beta$ , IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF relacionada con la gravedad de la COVID-19.**

Se divide entre moderados y severos al grupo en estudio compuesto por 308 pacientes confirmados con la enfermedad COVID-19, sub dividiendo a cada grupo según si sus condiciones eran progresivas o estables en cuanto a la gravedad con la que se manifestó la COVID19, cuantificando sus citoquinas a partir de muestras sanguíneas obtenidas al momento del ingreso hospitalario. (Extraído de Liu *et al.*, 2020).

### **1.3.- Desregulación del perfil inmunológico de pacientes infectados.**

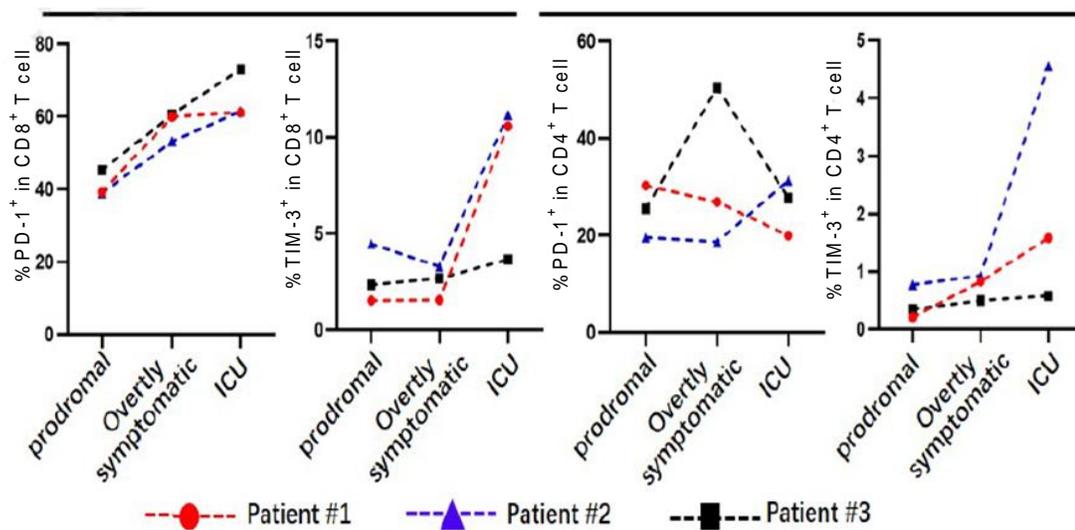
Las recientes investigaciones dan cuenta de una desregulación en la liberación de citoquinas en COVID-19. Se postula que la liberación de citoquinas en un comienzo se ve inhibida dada la represión que sufre la respuesta inmune innata, sin embargo, aún no se comprenden a cabalidad los mecanismos que expliquen este fenómeno. Aun así, se ha descrito que la proteína de la nucleocápside viral (N) regula dualmente las respuestas inmunitarias innatas, desarrollando una respuesta de carácter inflamatorio y/o anti-inflamatorio, asociándose principalmente con la fosforilación y translocación nuclear de las vías JAK/STAT. Siendo estas últimas proteínas encargadas de la liberación o supresión de citoquinas como IL-6 o IFN- $\gamma$ . La proteína N en bajas concentraciones genera una supresión de la señalización que generan las proteínas inflamatorias, mientras que a dosis altas se genera un aumento en los niveles y la señalización de citoquinas inflamatorias. Esto podría asociarse a una mayor replicación viral con el paso de los días tras la infección, dando paso a una respuesta inmune innata exacerbada, producto de la activación que generan estas proteínas inflamatorias sobre las células del sistema inmune a nivel pulmonar, principalmente en los macrófagos pulmonares (MP). Los MP sufren una hiperactivación que no permite el paso a una correcta respuesta inmune adaptativa, viéndose afectada así la activación de linfocitos T (Hoffmann et al., 2020; Tian et al., 2020; Zhao et al., 2020).

Estas células, consideradas la primera línea inmune a nivel pulmonar, son claves para explicar el SLC (Yoshikawa et al., 2009). Por una parte, los MP reciben las señales de activación proveniente de las células epiteliales alveolares infectadas a través de IFN- $\alpha/\beta$  gracias a los receptores en su superficie. De esta manera el MP genera el factor quimio atrayente de monocitos (MCP) provocando con ello una acumulación de MP activados, los cuales inducen una liberación descontrolada, y por lo tanto, el aumento de citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 principalmente, con el fin de combatir el ataque viral detectado, pero provocando un aumento en la severidad del SARS (Merad & Martin, 2020; Yang et al., 2020). Siguiendo la misma línea de liberación de citoquinas, también se ven activados los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, convirtiéndose en células T *helper* (Th1), generando aún más proteínas proinflamatorias IFN- $\alpha$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , factor estimulante de granulocitos, entre otras (Merad & Martin, 2020; Wilk et al., 2020). Estas citoquinas provocan que en los pacientes graves que padecen SARS comiencen a desarrollar una infiltración hacia el pulmón de monocitos inflamatorios CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup>. Estos últimos producen IL-6 en altas cantidades, la cual es factor fundamental en el SLC y que conlleva a la disfunción del tejido pulmonar y a la descontrolada liberación de citoquinas por monocitos y macrófagos (D. Zhang et al., 2021).

Una desregulación de las células inmunes pulmonares se asocia a una ineficiencia en cuanto a la eliminación efectiva de las partículas virales en el

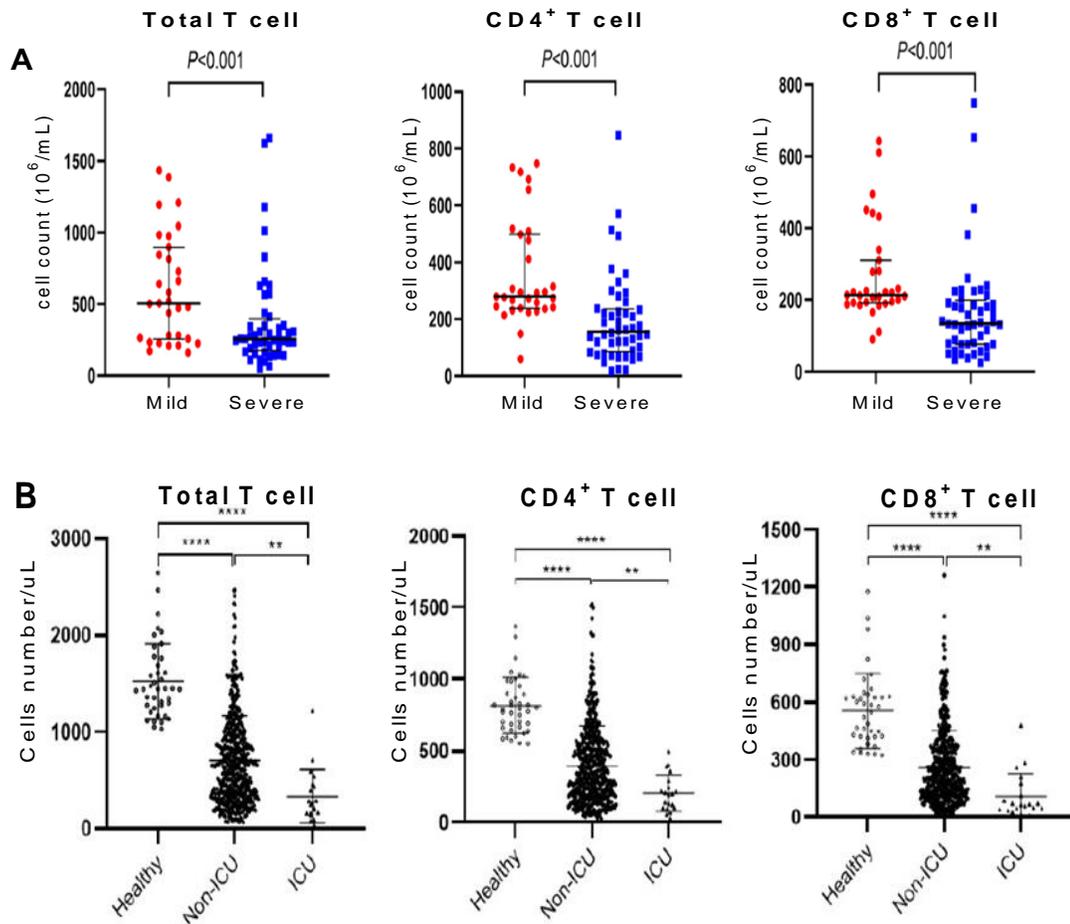
organismo huésped al retrasarse la respuesta inmune adaptativa, producto principalmente de la disfunción de las células T, en especial las CD-8<sup>+</sup> (Merad & Martin, 2020). Este agotamiento de células T aún no tiene una explicación concreta, aunque puede ser atribuido a una mezcla de factores, algunas investigaciones preliminares dicen que este agotamiento es causado debido que la infección viral diezma directamente el funcionamiento del bazo y los ganglios linfáticos, infectando y afectando la función de las células T (Feng et al., 2020).

Otros estudios proponen una correlación entre el ambiente inflamatorio generado por las altas concentraciones de citoquinas, principalmente IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , con la muerte y disfunción de las células T (Chen et al., 2020). El agotamiento en su función es posible identificarlo de manera concreta puesto que las células T, en especial CD-8<sup>+</sup>, comienzan a expresar moléculas inhibitorias en su superficie como PD-1 y Tim-3, los cuales aumentan a medida que la enfermedad progresa en gravedad (**Figura 5**). Lo concreto, es que los pacientes que cursan con la enfermedad COVID-19 padecen de una marcada linfopenia (**Figura 6-A**), afectando principalmente a las células T CD-8<sup>+</sup> y es especialmente prominente en los pacientes con la enfermedad en su etapa severa ingresados a UCI (**Figura 6-B**) (Chen et al., 2020).



**FIGURA 5. Seguimiento a los marcadores de agotamiento de células T.**

El estudio de Chen y cols., muestra el seguimiento de 3 pacientes durante la atención hospitalaria por la enfermedad COVID-19, detectando marcadores de agotamiento PD-1 y Tim-3 en la superficie de células T mediante citometría de flujo y análisis FACS (Extraído de Chen, et al., 2020.).



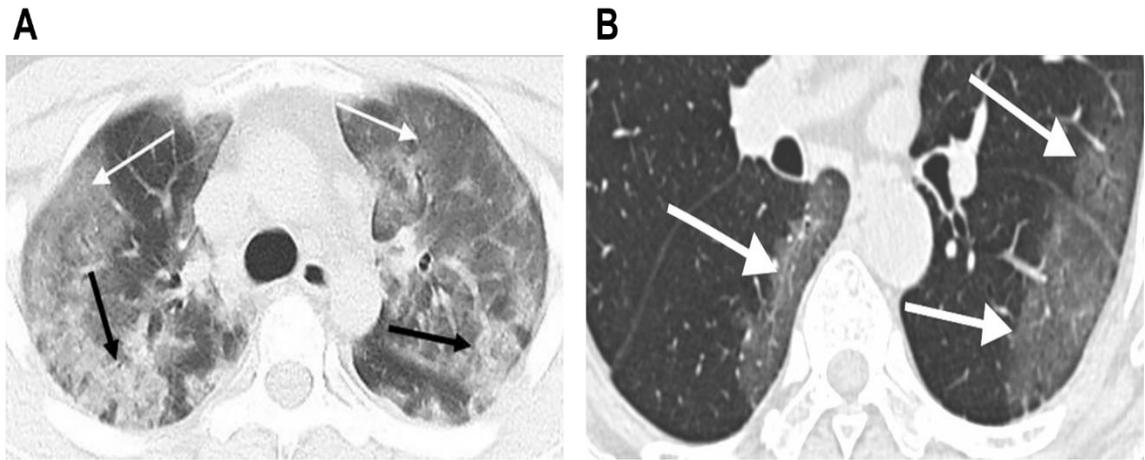
**FIGURA 6. Cuantificación total de células T, células T CD-4<sup>+</sup> y células T CD-8<sup>+</sup> por parte de dos estudios diferentes.**

El estudio de Song y cols., muestra los recuentos de leucocitos y subtipos de células T en pacientes con COVID-19 con y sin cuidados intensivos (UCI) y con distinto grado de severidad, además de controles sanos. **A)** Cuantificación y comparación de células T en 37 personas sanas y 79 pacientes al momento del ingreso hospitalario por la infección viral. Datos clínicos obtenidos a partir del sistema de registros médicos electrónicos del Primer Hospital Afiliado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zhejiang, China (Extraído de Song, et al., 2020.). **B)** Recuento de células T en 429 pacientes confirmados con la enfermedad y que durante su estadía progresaron en gravedad. Datos clínicos obtenidos desde el hospital general del comando del Teatro Central o en el hospital Hanyang en Wuhan, China (Extraído de Chen, et al., 2020.).

#### **1.4.- Estado pulmonar durante la fase aguda de la COVID-19.**

Los fenómenos que se desarrollan a nivel molecular, terminan por desencadenar el agravamiento de la enfermedad y con ello el progreso del daño a nivel estructural en el pulmón, finalizando en el desarrollo del SARS. Es conocido, dada la contingencia de la actual pandemia, que las características pulmonares, apreciables por diferentes exámenes como TCT, son claves para explicar la gravedad de la enfermedad, su progreso e incluso su diagnóstico (Francone et al., 2020; Li et al., 2020; S. Zhang et al., 2021).

Los pacientes presentan patrones imagenológicos que ya se encuentran caracterizados por la comunidad científica, siendo típico entre individuos que padecen COVID-19 y que cursan con una hipoxemia leve o severa. En estos casos se presentan opacidades pulmonares en vidrio esmerilado o focos de consolidación en el parénquima pulmonar al observar sus TCT (**Figura 7**), tal como fue descrito por Chung y colaboradores en un estudio realizado en China donde revisaron las TCT de 21 pacientes sintomáticos infectados por el virus SARS-CoV-2, encontrando que 18 de ellos presentaron una TCT alterada. A partir de estos resultados y del seguimiento de los pacientes durante su estadía intrahospitalaria los investigadores concluyen que la progresión de la enfermedad se manifestó con un aumento de la extensión y la densidad de las opacidades pulmonares (Chung et al., 2020).



**FIGURA 7. Caracterización de opacidades pulmonares en TCT generadas durante la COVID-19.**

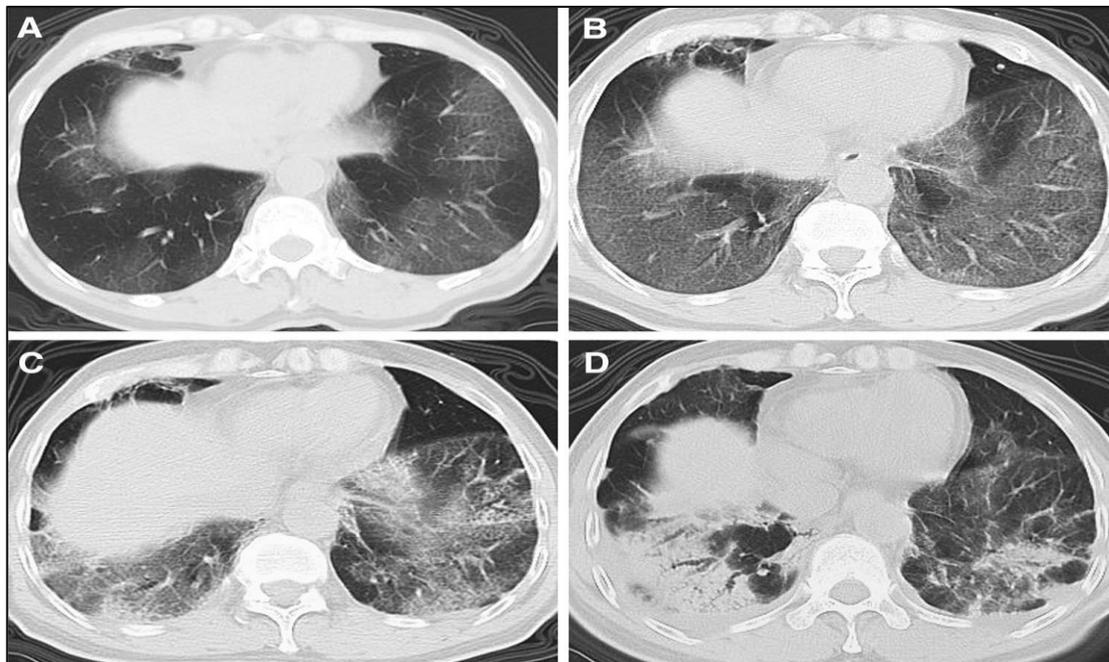
**A)** Imagen perteneciente a un hombre de 29 años que requirió ingreso a la unidad de cuidados intensivos. En ella se aprecian opacidades en vidrio esmerilado y opacidades difusas bilaterales (Flechas blancas), además se observan focos de consolidación (Flechas negras). **B)** Imagen de un hombre de 69 años donde se aprecian opacidades en vidrio esmerilado (Flechas blancas). (Extraído de Chung *et al.*, 2020).

Aun existiendo un avance en cuanto a las investigaciones que buscan dilucidar las problemáticas que abarca tal daño pulmonar provocado por el SARS, sigue siendo la principal complicación respiratoria entre pacientes que padecen una COVID-19 moderada o severa, conllevando a la muerte en muchos casos (Huang et al., 2020). Los pacientes que fallecen a causa de las complicaciones que conlleva la COVID-19 presentan grandes anomalías respiratorias observables mediante TCT, las cuales difieren a las TCT de un paciente que consigue superar la enfermedad (Liang et al., 2020).

En la investigación realizada en China por Liang y colaboradores fue posible realizar un seguimiento de las imágenes obtenidas por TCT de 47 pacientes que presentaron la enfermedad y alcanzaron la etapa grave, de ellos, 26 pacientes fueron dados de alta y 21 pacientes fallecieron. El estudio concluyó que los cambios en las TCT difieren entre los pacientes recuperados y los pacientes muertos, donde si bien los pacientes recuperados mostraron una mejoría imagenológica en cuanto a la extensión del pulmón afectado, a la tercera semana de la patología aún mantenían opacidades de distribución subpleural y aleatoria (**Figura 8**) (Liang et al., 2020).

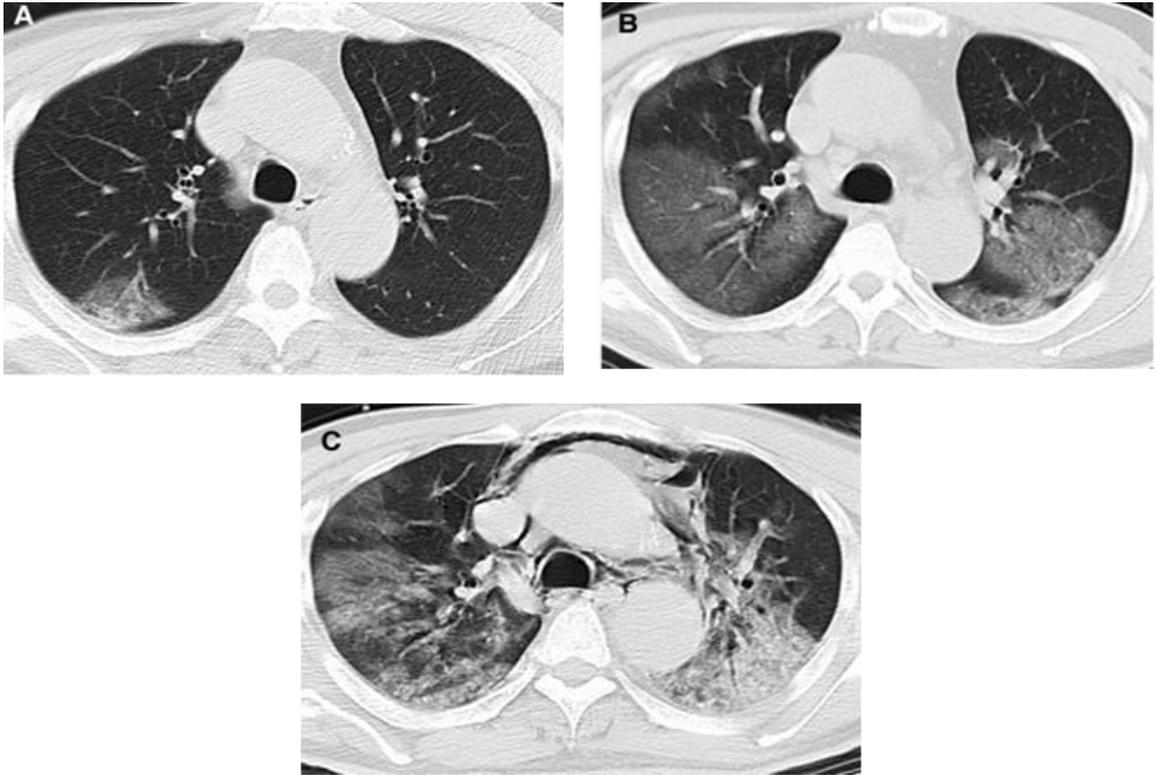
Por otra parte, los pacientes fallecidos mantuvieron siempre una mayor extensión de las anomalías parenquimatosas en comparación al grupo dado de alta (**Figura 9**), **sugiriendo** que los pacientes fallecidos presentaron un SLC más intenso a nivel pulmonar. Además, este daño pulmonar asociado a la gran liberación de

citoquinas, se ve representado a nivel celular por remodelaciones de sus organelos, incluyendo la mitocondria, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y los peroxisomas (Wang et al., 2020).



**FIGURA 8. TCT representativa de grupo de pacientes dados de alta.**

Seguimiento mediante imágenes de tomografías computarizadas que muestran a un paciente que alcanzó la etapa severa de la enfermedad COVID-19 y logró el alta médica. **A)** Imagen del día 4 de la enfermedad muestra opacidades en vidrio esmerilado multifocales en los lóbulos inferiores, con distribución subpleural. **B)** imagen del día 7 de la enfermedad mostró opacidades aumentadas, con engrosamiento del septo interlobulillar e intralobulillar y con distribución difusa. **C)** imagen del día 12 de la enfermedad mostró disminución de las opacidades, siendo irregulares y superpuestas. **D)** imagen del día 23 de la enfermedad muestra opacidades de patrón mixto (Extraído de Liang *et al.*, 2020.).



**FIGURA 9. TCT representativa de grupo de pacientes fallecidos.**

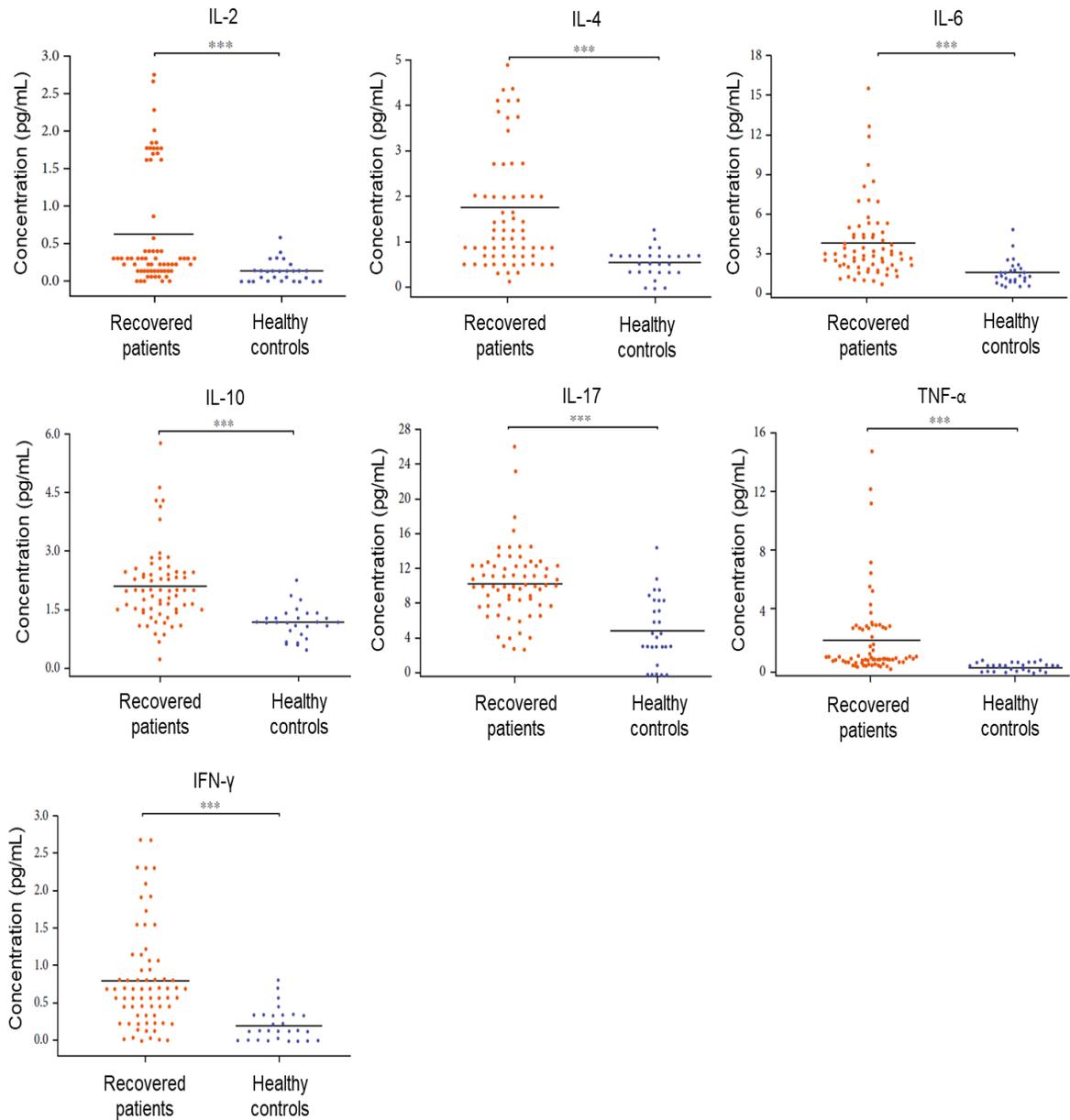
Seguimiento mediante imágenes de tomografías computarizadas que muestran a un paciente fallecido por la patología COVID-19. **A)** Imagen del día 6 de la enfermedad muestra opacidades en vidrio esmerilado en el lóbulo superior derecho, con una distribución subpleural. **B)** imagen del día 14 de la enfermedad mostró un claro aumento en las opacidades en vidrio esmerilado, extendiéndose a varios lóbulos. **C)** imagen del día 21 de la enfermedad muestra la transformación de las opacidades en vidrio esmerilado a focos de consolidación, con un neumomediastino (Extraído de Liang *et al.*, 2020.).

## **1.5.- Características de pacientes post COVID-19.**

Si bien la patología COVID-19 afecta de forma variada a cada individuo en relación a la severidad (leve, moderado o severo), en todos los niveles de estas distintas severidades existen datos publicados que hablan sobre la capacidad de lograr superar la patología, incluyendo a los pacientes que cursan con grandes complicaciones respiratorias producto de un desarrollo agresivo del SARS (Fernández-de-Las-Peñas et al., 2021; Liang et al., 2020; Salama et al., 2021).

Las manifestaciones de la patología durante su etapa aguda, como lo son la tormenta de citoquinas o las afecciones a nivel pulmonar, decrecen con el paso de los días lo que conlleva a dar por superada la patología entre los pacientes moderados y severos, donde tras la revisión médica correspondiente son dados de alta de su respectivo recinto asistencial (Zhao et al., 2020). Es en este grupo de pacientes que superan la COVID-19 es donde actualmente se centran las investigaciones científicas relacionadas con la infección por SARS-CoV-2. Puesto que si bien son variadas las investigaciones en grupos de pacientes post COVID-19 aún son inciertas las características sistémicas o secuelas en concreto que la COVID-19 puede provocar. Así como queda demostrado en una investigación realizada en China por Hasichaolu y colaboradores, donde evaluó el perfil de citoquinas presentes en pacientes que lograron superar la COVID-19, a partir de muestras sanguíneas obtenidas dos semanas luego de recibir el alta médica. Los investigadores determinaron que los niveles de citoquinas como IL-

2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  vuelven poco a poco a sus rangos normales después de la alta médica, pero indican también, que todas las citoquinas evaluadas presentan concentraciones significativamente más altas en el grupo de pacientes que superan la COVID-19 en comparación a un grupo de individuos que nunca sufrieron la infección por SARS-CoV-2 (**Figura 10**). Lo que sugiere la necesidad de una observación médica continua después del alta de los pacientes, para evaluar si estos niveles elevados de proteínas inflamatorias conllevan a alguna complicación a largo plazo en los pacientes (Hasichaolu et al., 2020).

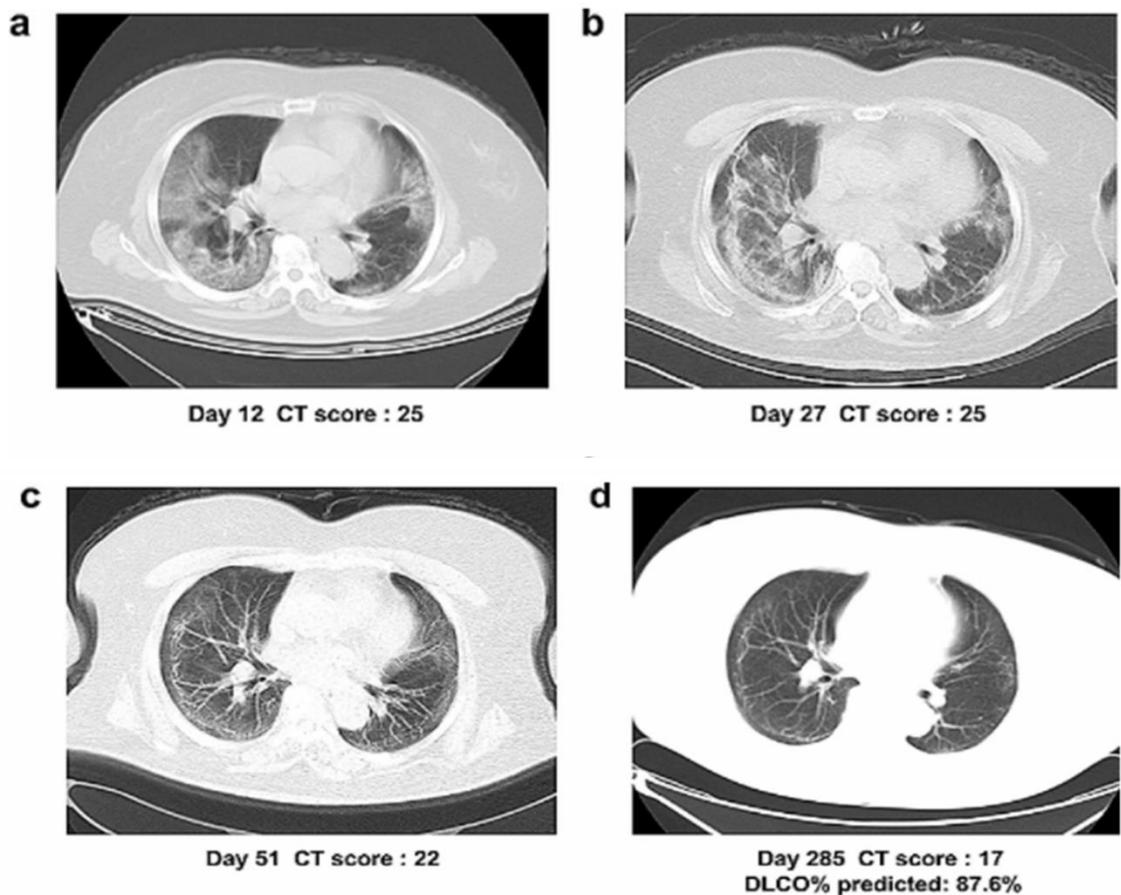


**FIGURA 10. Cuantificación de citoquinas post COVID-19.**

Cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en 68 pacientes que padecieron COVID-19 recuperados (PCR negativa) y 28 personas sanas (previo examen físico). Cuantificación mediante citometría de flujo a partir de muestras de suero obtenidas dos semanas tras el alta médica (Extraído de Hasichaolu *et al.*, 2020.).

El poco seguimiento médico a los pacientes tras superar la enfermedad ha conllevado a que las investigaciones científicas intenten descifrar las complicaciones que la patología deja a su paso en los individuos que la padecen, siendo las de carácter respiratorio las más ampliamente estudiadas (Liang et al., 2020; S. Zhang et al., 2021). Esta evaluación de la condición pulmonar post COVID-19 se da a través de distintos exámenes respiratorios que poco a poco toman una mayor relevancia, identificando daño estructural mediante TCT o algún daño de tipo funcional mediante el examen de capacidad de difusión pulmonar (DLCO) o espirometría (Chung et al., 2020; Guler et al., 2021; Qin et al., 2021).

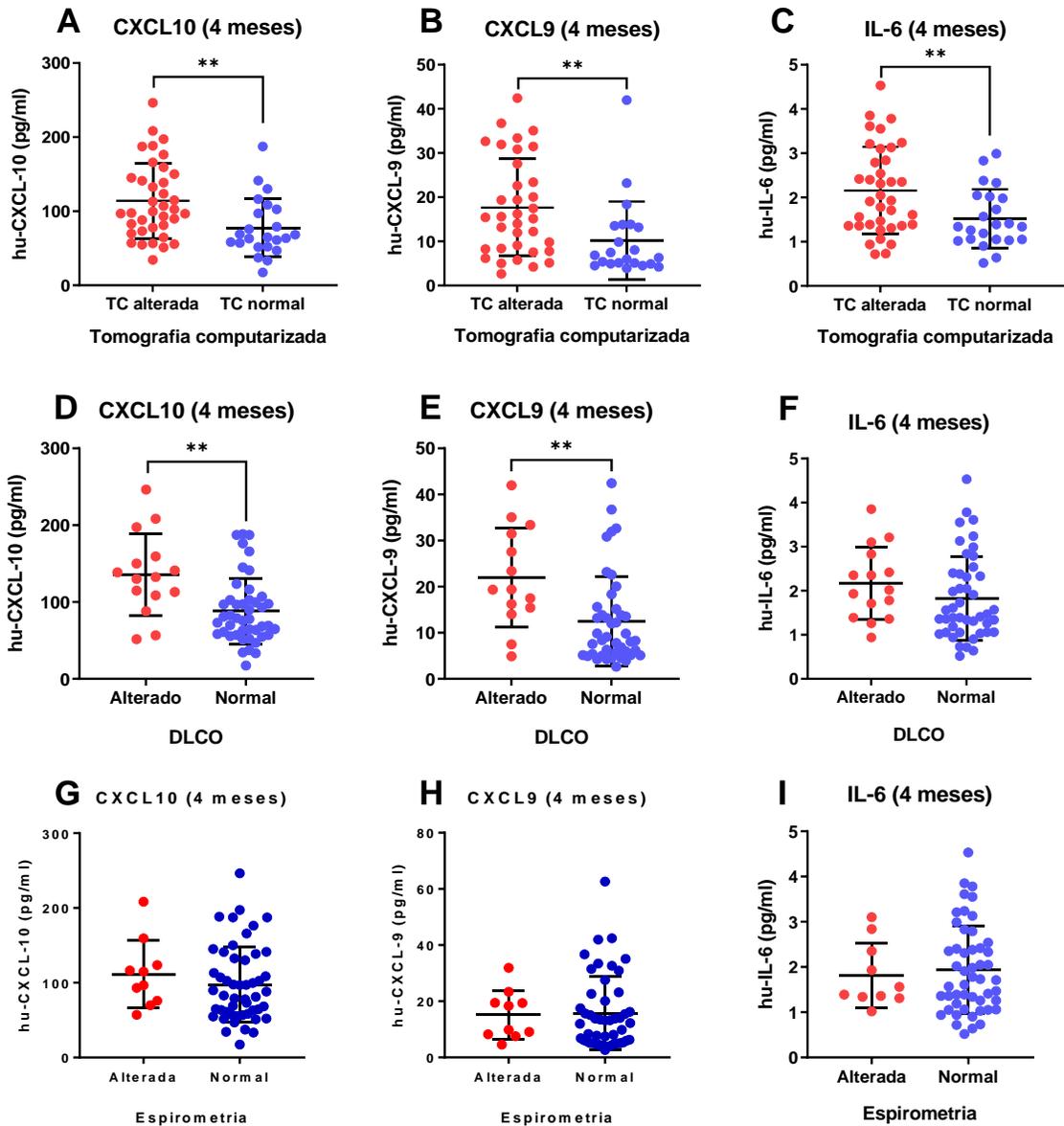
A partir de aquello, se ha descrito que los individuos que padecen una COVID-19 severa, acompañada o no por un SARS, presentan algún grado de daño pulmonar luego de superar la patología. Zhang y colaboradores, realizaron un seguimiento mediante TCT y exámenes de DLCO de la condición pulmonar (**Figura 11**) de 40 individuos hasta 290 días luego de recibir el alta médica, donde 25 de ellos presentaron una COVID-19 severa. Los investigadores identificaron en el seguimiento que los pacientes que cursaron una COVID-19 severa presentaron un deterioro de la funcionalidad pulmonar evaluado mediante DLCO. Además, presentaron a la vez un daño estructural con puntuación de TCT más altas en comparación con los casos leves. En el mismo estudio, identificaron que 12 de los 40 pacientes que componen el grupo en estudio presentaban a los 8 meses post COVID-19 una TCT alterada (S. Zhang et al., 2021).



**FIGURA 11. TCT del seguimiento de la condición pulmonar en paciente post COVID-19.**

Tomografías computarizadas pertenecientes a paciente de 65 años que cursó COVID-19 severa. Los exámenes fueron realizados en diferentes tiempos hasta 8 meses luego de la alta médica como parte de un seguimiento de la condición pulmonar tras superar la COVID-19. **A)** TCT obtenida 12 días tras la alta médica, con un puntaje de severidad (CT) igual a 25 presentando opacidades en vidrio esmerilado, líneas irregulares y focos de consolidación. **B)** TCT obtenida 27 días tras la alta médica, sin mejoras significativas y un CT de 25. **C)** TCT obtenida el día 51 tras la alta médica con un CT de 22, presenta una disminución en la densidad de las opacidades desapareciendo casi por completo los focos de consolidación. **D)** TCT obtenida el día 285 tras la alta médica con un CT de 17, presenta una clara disminución en la densidad y extensión de las opacidades, observándose solo algunos patrones en vidrio esmerilado. Esta última TCT se encuentra acompañada con el resultado de 87,6% en el examen DLCO, lo que habla de una mejora en cuanto a la funcionalidad pulmonar recién a 8 meses post alta médica (Extraído de Zhang *et al.*, 2021).

A partir de lo antes mencionado, nace la necesidad de identificar la existencia de alguna relación entre la elevación de citoquinas y las complicaciones respiratorias dentro de un contexto post COVID-19, con la finalidad de mejorar el bienestar de los pacientes recuperados. En base a esto es que, a partir de los datos obtenidos en la tesis para optar al título de bioquímico realizada por el presente investigador durante el año 2021, fue posible categorizar las secuelas pulmonares de 60 pacientes chilenos tras superar la enfermedad en base a sus concentraciones de citoquinas 4 meses post COVID-19 (Sanhueza *et al.*, 2021). Determinando que por sí solo el examen alterado de TCT o el examen alterado de DLCO se relacionan con una elevación de citoquinas como IL-6; o quimioquinas como CXCL-9 y CXCL-10 tras 4 meses superada la infección por SARS-CoV-2. Sin encontrar dicha relación entre la cuantificación de citoquinas y el examen de espirometría (**Figura 12**). En base a estos resultados, es posible caracterizar al grupo en estudio, tomando en consideración que los pacientes secuelados son todos los pacientes que presenten por sí solo un examen de TCT, DLCO o espirometría alterado a 4 meses post COVID-19 y que los pacientes severamente secuelados o con disfunción pulmonar a largo plazo (DPLP) serán aquellos que presentan un examen de TCT y DLCO alterado a 4 meses post COVID-19. Por lo tanto, se busca de identificar si esta nueva categorización del grupo en estudio guarda alguna relación con las concentraciones de citoquinas y quimioquinas evaluadas a partir de muestras sanguíneas pertenecientes a un periodo de 4 meses post COVID-19.



**FIGURA 12. Cuantificación de citoquinas y quimioquinas en base a su relación con el estado pulmonar 4 meses post COVID-19**

Cuantificación de citoquinas y quimioquinas en pacientes 4 meses post COVID-19 a partir de muestras de suero, sub dividiendo al grupo en estudio según la presencia alterada por si sola del examen de TCT, del examen de DLCO o el examen de espirometría. Cuantificación de CXCL-10, CXCL-9 e IL-6 a partir de muestras obtenidas 4 meses post COVID-19, con diferencias significativas entre los grupos que presentan o no un examen alterado de (A – C) TCT, (D – F) DLCO o (G – I) Espirometría. (T test, Valor p: \*\*<0.01) (Extraído de Sanhueza et al., 2021).

## **2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

El problema de la presente investigación radica entonces en que dada la actual pandemia e infección viral se abrió una ventana para múltiples análisis, los cuales hoy en día se centran en caracterizar correctamente a los pacientes que se encuentran padeciendo la COVID-19 y sus posibles consecuencias o secuelas tras superarla. Es así como aún no se ha descrito como se asocian los niveles de citoquinas y quimioquinas de pacientes post COVID-19 con las secuelas pulmonares luego de la infección por SARS-CoV-2. Generándose así la pregunta de investigación: ¿Qué asociación hay entre las citoquinas y las secuelas pulmonares de los pacientes que presentaron distintos grados de severidad durante la infección por SARS-CoV-2 y que son evaluados a los 4 y 12 meses post COVID-19?

### **3. HIPÓTESIS**

La presencia de altos niveles de citoquinas en suero se asocia con secuelas estructurales y funcionales del pulmón a los 4 y 12 meses post COVID-19 en pacientes recuperados que cursaron la enfermedad en sus estados leve, moderado y severo.

## **4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la asociación de los niveles de citoquinas con las secuelas estructurales y funcionales del pulmón a los 4 y 12 meses post COVID-19 de pacientes que cursaron la enfermedad en sus estados leve, moderado y severo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1)** Determinar las secuelas pulmonares estructurales y funcionales a los 4 y 12 meses post infección en pacientes recuperados de COVID-19.
  
- 2)** Determinar los niveles de citoquinas y quimioquinas en suero a los 4 y 12 meses post infección en pacientes recuperados de COVID-19.
  
- 3)** Comparar los niveles de citoquinas y quimioquinas circulantes entre pacientes recuperados de COVID-19 según sus secuelas pulmonares a los 4 y 12 meses post infección.
  
- 4)** Analizar las vías canónicas diferencialmente activadas en circulación de pacientes recuperados de COVID-19 con secuelas pulmonares por medio de análisis de proteómico durante el estado agudo y 4 meses post infección.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.- Recopilación de muestras.

Se realizó una recopilación de una serie de parámetros en 60 pacientes que cursaron la patología COVID-19 y lograron recuperarse, siendo dados de alta tras un chequeo médico. Entre ellos existen casos leves, moderados y severos de la patología. La toma de muestras sanguíneas se realizó en 60 pacientes a los 4 meses luego del diagnóstico de la COVID-19 y se repitió a los 12 meses tras el alta médica en 55 de los 60 pacientes iniciales. Esta diferencia de 5 participantes entre la primera y segunda toma de muestra se produjo debido a que 2 pacientes resultaron embarazadas, por lo que bajo esta condición no cumplen con los criterios de inclusión definidos para el grupo en estudio (**Anexo-1**) y otros 3 individuos desistieron de participar en esta segunda toma de muestra.

Además, se obtendrán 20 muestras de suero correspondientes a la etapa activa de la patología. Estas muestras pertenecen a 20 pacientes severos de entre los 60 pacientes que componen el grupo en estudio.

También, se recopilarán muestras de suero de personas que no han sufrido la infección por SARS-CoV-2, estos últimos serán los controles sanos del estudio.

La investigación se rige por la aprobación del Comité Ético Científico del servicio de salud del Bio-Bio y por el Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción (**Anexo-2**).

## **5.2.- Recopilación de parámetros clínicos.**

En el reclutamiento de los pacientes a los 4 y 12 meses, a partir de las muestras sanguíneas obtenidas se determinaron parámetros clínicos como: grupo sanguíneo y recuento celular.

En particular, durante el reclutamiento de 4 meses se realizaron exámenes kinesiológicos para analizar la condición física de los pacientes mediante los siguientes estudios; test de espirometría, *handgrip strength* (HGS) y test de marcha de 6 minutos (TM6M). Además de exámenes como TCT y capacidad de difusión de monóxido de carbono pulmonar (DLCO). Por otra parte, en el reclutamiento de 12 meses, se repitieron en todos los pacientes los exámenes TM6M y HGS, mientras que sólo se repitieron los test de espirometría y DLCO en los pacientes que presentaron alguno de estos test alterados en el reclutamiento de 4 meses.

### **5.3.- Obtención de la evaluación del daño estructural del pulmón mediante Tomografías computarizadas de tórax.**

Las TCT han sido un gran avance científico y continuamente se buscan mejoras en ellas. Esta técnica busca superar tres limitaciones que posee la radiología convencional, primero, la imposibilidad de mostrar en una imagen radiológica bidimensional toda la información contenida en una escena tridimensional, debido a la superposición de los objetos en la imagen que se obtenía; segundo, la limitada capacidad para distinguir tejidos blandos; y finalmente, la imposibilidad de cuantificar las densidades de los tejidos. Gracias a estas características, es posible aplicar esta técnica para distinguir el daño estructural pulmonar que produce la COVID-19 en sus distintas etapas, llegando a ser incluso utilizada para el diagnóstico de la enfermedad (Chen et al., 2020; Ramírez Giraldo et al., 2008).

En base a esto, se obtuvieron las TCT en el reclutamiento de 4 meses posterior a la alta médica de los 60 pacientes recuperados de la patología con el fin de evaluar el daño estructural del pulmón y ser un parámetro para clasificar secuelas pulmonares en el grupo en estudio. Las TCT fueron evaluadas por un médico que compone el equipo de trabajo del proyecto, otorgando la puntuación correspondiente a las imágenes según los siguientes parámetros evaluados: Vidrio esmerilado, vidrio esmerilado mixto, focos de consolidación, engrosamiento interlobulillar, bronquiectasias, atelectasia, nódulo sólido, nódulo

no sólido, número de lóbulos afectados, lesiones reticulares, lesiones fibróticas y aire atrapado.

El puntaje otorgado por el médico corresponde al "puntaje de severidad total" o TSS por su traducción al inglés. El cual nos da una aproximación de la extensión del pulmón afectado. Se obtuvo calculando el porcentaje aproximado de compromiso de cada uno de los cinco lóbulos pulmonares, que dará una determinada puntuación. Si hay 0% de afección se puntúa como 0, si hay una afección entre 1% al 25% se puntúa como 1, si hay una afección entre el 26% al 50% se puntúa como 2, si hay una afección entre el 51% al 75% se puntúa como 3 y finalmente si hay una afección entre el 76% al 100% se puntúa como 4. El TSS se alcanzó sumando los cinco puntajes de los lóbulos y posee un rango de puntajes posibles de 0 a 20 (Cáceres-Bernaola et al., 2020). Se considerará alterada la TCT cuando el TSS sea igual o mayor a 1.

#### **5.4.- Obtención de la evaluación del daño en la funcionalidad pulmonar mediante DLCO.**

Para evaluar la funcionalidad pulmonar y obtener la data necesaria del proyecto, se realizó un test de funcionalidad en los 60 pacientes recuperados, por parte de un médico que compone el equipo de trabajo. Este examen que determinó la existencia de una problemática funcional a nivel pulmonar también fue

considerado como un criterio que estableció la existencia de secuelas pulmonar entre los participantes. Mediante el test DLCO se evaluó el proceso de difusión del monóxido de carbono (CO), que incluye el paso a través de la barrera alvéolo-capilar y su unión con la hemoglobina (Hb). En definitiva, representa el contacto de los alvéolos ventilados con el lecho capilar. De esto se desprende que una reducción de la superficie de intercambio gaseoso o un aumento en el grosor de la membrana alvéolo-capilar disminuyen la difusión de CO (CAVIEDES S et al., 2014). De esta manera, se consideró como un DLCO alterado cuando su resultado con respecto a la funcionalidad pulmonar fue menor al 80%.

#### **5.5.- Evaluación física mediante test de espirometría, TM6M y HGS.**

El test de espirometría fue uno de los exámenes realizados para registrar la condición mecánica pulmonar, este se realizó con un instrumento llamado espirómetro, identificando la obstrucción del flujo aéreo al medir flujos y volúmenes de aire exhalado desde una inspiración máxima (Benítez-Pérez et al., 2016). La suma de los diferentes parámetros evaluados en el test de espirometría conlleva a un resultado final el cual si es menor al 70% se consideró como alterado. El resultado de la espirometría no determinó para esta investigación una problemática funcional en la clasificación de pacientes secueledos post COVID-19, pero los parámetros individuales evaluados en este test respiratorio fueron considerados como un punto comparativo entre los diferentes grupos

categorizados según sus secuelas respiratorias, estos parámetros individuales son: Capacidad vital forzada (FVC), Volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV<sub>1</sub>), Relación entre FEV<sub>1</sub>/FVC y el Flujo espiratorio máximo (FEFmax). Cada uno de estos parámetros fueron evaluados previo y posterior a una broncodilatación con 200 a 400µg de salbutamol. La maniobra espiratoria se evaluó en triplicado, previo y posterior a la broncodilatación, obteniendo un promedio para cada uno de los parámetros individuales que componen la espirometría.

El TM6M también fue realizado entre los individuos para evaluar la capacidad de ejercicio funcional de los participantes. Este examen de baja complejidad se ejecutó tras indicar al paciente que camine lo más lejos posible a lo largo de 30 metros durante un periodo de 6 minutos (Agarwala & Salzman, 2020), registrando así la cantidad de metros recorridos durante este tiempo. Además, se midió previo y posterior al ejercicio la saturación parcial de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) mediante un saturómetro y la fatiga mediante el índice de fatiga de Borg. La fatiga solo fue registrada en el TM6M realizado a los 4 meses post COVID-19.

Finalmente, el test HGS se llevó a cabo para evaluar la fuerza de agarre manual de los participantes, esto tras indicar a los pacientes que ejercieran la máxima fuerza posible sobre el instrumento VIFER, el cual permitió registrar en kilogramos la fuerza aplicada por los individuos (Cronin et al., 2017).

## 5.6.- Cuantificación de quimioquinas y citoquinas.

Se evaluaron citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ , además de quimioquinas, como CXCL-10, CCL-2, CXCL9 y CCL5 en los 60 pacientes recuperados y en los controles sanos a partir de muestras de suero de los individuos. Para este fin se aplicó la técnica citometría de flujo, donde se utilizaron los kits *Cytometric Bead Array* (CBA), uno para la cuantificación de citoquinas y otro para la cuantificación de quimioquinas, ambos se almacenaron entre 2 a 8°C.

Los kits se basan en la medición de varias citoquinas a la vez a partir de una misma muestra, para ello, es que usa un método de captura del analito, ya sea soluble o un conjunto de analitos, a partir del uso de perlas de tamaño y fluorescencia conocidas, las cuales se encuentran conjugadas con un anticuerpo específico.

Para que la unión de la perla de captura y el analito fuese cuantificable es que se utilizó el reactivo de detección proporcionado en el kit, el cual es una mezcla de anticuerpos conjugados con ficoeritrina (PE), que proporciona una señal fluorescente en proporción a la cantidad de analito unido. De esta manera es que gracias a la incubación durante 3 horas a temperatura ambiente y protegida de la luz de 50 $\mu$ L de muestra, 2 $\mu$ L de cada perla de captura y 10 $\mu$ L de reactivo de detección se formó así un complejo sándwich (perla de captura + analito + reactivo de detección) que fue posible medir usando citometría de flujo para

identificar partículas con características de fluorescencia tanto de la perla como del detector. (Manual de instrucciones *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit*).

A partir de lo explicado anteriormente, es que para la medición de citoquinas en el citómetro de flujo fue necesaria la realización de estándares, para ello se utilizaron quimiocinas humanas liofilizadas del kit, las cuales debieron ser tratadas con el fin de que se reconstituyan y diluyan en serie inmediatamente antes de mezclar con las perlas de captura y el reactivo de detección

El procedimiento realizado se basó en que las quimiocinas humanas liofilizadas de un vial estándar fueron transferidos a un tubo de polipropileno de 15 ml, el cual fue reconstituido con 4 mL de diluyente de ensayo por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizó una dilución en serie con concentraciones desde 2500 pg/mL hasta un control negativo de 0 pg/mL (**Tabla 1**). 50 µL de las diluciones del estándar de quimiocinas humanas fueron transferidas a los tubos de citometría.

**TABLA 1. Distribución de diluciones estándar en los tubos control.**

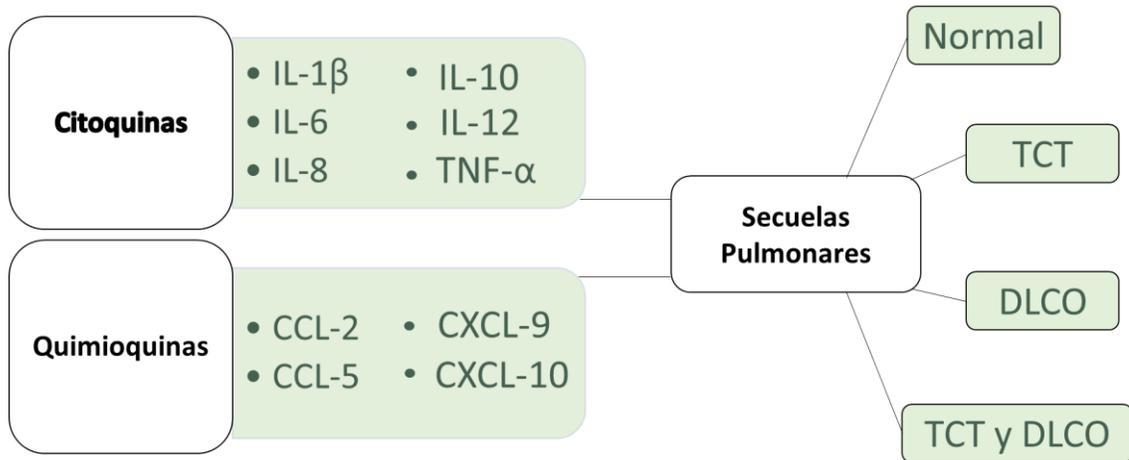
Etiqueta del tubo	Concentración (pg/mL)	Dilución estándar de citoquinas
1	0 (control negativo)	Solo diluyente de ensayo
2	10	1:256
3	20	1:128
4	40	1:64
5	80	1:32
6	156	1:16
7	312,5	1:8
8	625	1:4
9	1250	1:2
10	2500	Estándar superior

Posteriormente, se añadieron 2µL de cada perla de captura a los tubos que contienen 50µL de las diluciones de estándar. Luego, se añadieron 10 µL del reactivo de detección de quimiocina PE humana a todos los tubos y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, los tubos fueron lavados (1500rpm por 10min.) descartando el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 200 µL de PBS. Luego se calibró el citómetro de flujo y se procedió a medir las muestras. El resultado dependió de la intensidad de la fluorescencia de PE de cada complejo sándwich, revelando la concentración de esa citoquina/quimioquina. Después de obtener los resultados de la citometría de flujo, se utilizó el software FCAP Array™ para generar resultados en formato gráfico y tabular.

#### **5.6.- Análisis estadístico.**

Finalmente, la cuantificación de citoquinas y quimioquinas realizada al grupo en estudio y grupo control fue comparada estadísticamente con la data sobre las secuelas pulmonares de los pacientes y con la data general del proyecto (**Figura 11**). La categorización de pacientes para ser evaluados estadísticamente dependió de sus resultados en los exámenes respiratorios TCT y DLCO obtenidos 4 meses post COVID-19, de esta manera el grupo “Normal” se compuso por los pacientes que presentaron un resultado normal de TCT y DLCO, se catalogaron como grupos “secuelados” a los pacientes que presentaron por sí

solo un examen de DLCO o TCT alterado a 4 meses post COVID-19, mientras que los pacientes severamente secuestrados o con disfunción pulmonar a largo plazo (DPLP) fueron aquellos pacientes que a los 4 meses presentaron una alteración conjunta de los exámenes DLCO y TCT. El análisis se llevó a cabo mediante el uso del programa *GraphPad Prism*, con el cual fue posible realizar comparaciones gráficas de entre 2 variables mediante T-test con datos pareados y no pareados, o más de 2 variables mediante Test Anova. La significancia fue considerada cuando el valor *P* fue menor a 0,05.



**FIGURA 13. Esquema del trabajo estadístico según los diferentes parámetros comparables.**

Representación de las posibles comparaciones mediante test estadísticos del programa *GraphPad Prism*. Estas comparaciones se realizaron en base a la cuantificación de citoquinas y quimioquinas a los 4 y 12 meses post COVID-19 y las secuelas pulmonares. Definiendo de esta manera como Normal a aquellos pacientes que no presentan alteración en el examen de TCT y DLCO, fueron secueledos los pacientes recuperados que a los 4 meses post COVID-19 presentaron por sí solo un examen alterado de DLCO o TCT y, por último, como severamente secueledos a aquellos pacientes que presentaron un examen alterado de DLCO en conjunto a una TCT alterada a los 4 meses post COVID-19.

## **5.7.- Análisis proteómico de muestras agudas y 4 meses post infección.**

El análisis proteómico de las vías canónicas activadas diferencialmente se realizó mediante un trabajo en conjunto con el instituto MELISA a partir de 16 muestras de suero correspondientes a la etapa activa de pacientes que cursaron COVID-19 severo y otras 16 muestras correspondientes al periodo de 4 meses post COVID-19. Estas muestras pertenecían a 16 pacientes que componen el grupo en estudio, donde 8 de ellos pertenecían al grupo secuelado con TCT alterado por si sola y otros 8 pertenecían al grupo con DPLP. Fueron seleccionadas estas muestras como representativas puesto que durante la etapa activa de la COVID-19 estos 16 pacientes presentaron características similares en cuanto a la gravedad de la patología, tratamiento recibido, edad y comorbilidades previas, pero luego, durante los reclutamientos, fue posible observar diferencias en las secuelas pulmonares y los diferentes parámetros analizados.

### **5.7.1.- Depleción de proteína sérica.**

Las proteínas séricas se depletaron con HU-14-columnas de centrifugación de agotamiento de proteínas (Agilent, EE. UU.), añadiendo 800 µg de proteínas nativas séricas por columna y se continuó el protocolo sugerido por el fabricante.

### **5.7.2.- Extracción y digestión de proteínas para nLC-MS/MS.**

Las proteínas previamente depletadas se sometieron a precipitación utilizando acetona fría al 100% v/v 5:1 v/v y se incubaron durante la noche a -20°C, luego se centrifugaron a 15.000 x g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Luego se lavó el sedimento 3 veces con acetona al 90% v/v, posteriormente las proteínas se secaron en un concentrador rotatorio a 4°C, y finalmente se resuspendieron en urea 8 M con bicarbonato de amonio 25 mM pH 8.

Las proteínas se redujeron utilizando una concentración final de DTT 20 mM durante una hora, luego se alquilaron incubando durante 1 hora con yodoacetamida 20 mM en oscuridad, luego se cuantificaron 10 µg de proteínas utilizando el kit de cuantificación de proteínas Qubit. El total fue diluido en urea 1 M usando bicarbonato de amonio 25 mM pH 8, luego las proteínas fueron digeridas con tripsina/LyC (Promega) en proporción 1:50 durante la noche a 37°C. Los péptidos fueron limpiados usando SepPack Vac C18 (Waters, USA) usando el protocolo sugerido por el fabricante, los péptidos eluidos fueron secados usando un concentrador rotatorio a 4°C y resuspendidos en ACN al 2% con 0.1% v/v de Ácido Fórmico (MERCK Alemania), y cuantificados usando Direct detect (MERCK Millipore).

### **5.7.3.- Fraccionamiento de péptidos y construcción de biblioteca.**

El fraccionamiento de fase inversa de pH alto se realizó en un AKTA Avant25 (General Electric) acoplado a una colección de fracciones refrigeradas. Los péptidos purificados se separaron en una columna de fase reversa BHE de 2,1 cm x 5 cm (Waters) a un caudal de 0,2 ml/min a pH 10. El gradiente binario comenzó con tampón B al 3 % (ACN al 90 % en formato de amonio 5 mM) seguido de aumentos lineales al primer 40 % de B en 30 min, al 60 % de B en 15 minutos y finalmente al 85 % de B en 5 minutos. Cada muestra se fraccionó en 24 fracciones en intervalos de volumen de 400 µl. Las fracciones se secaron en una centrífuga de vacío y se reconstituyeron en agua con 2 % de ACN y 0,1 % de FA y se concatenaron en 8 fracciones.

Cada fracción se inyectó en un sistema de cromatografía nano-HPLC nanoElute (Bruker Daltonics), los péptidos (200 ng de digerido) se separaron en 60 minutos a una velocidad de flujo de 400 nL/min en una columna de fase reversa Aurora Series CSI (25 cm x 75 µm de d.i. C18 1,6 µm) (ionopticks Australia) con 50°C. Las fases móviles A y B fueron agua y acetonitrilo con 0,1 % en volumen de FA, respectivamente. El %B se incrementó linealmente del 2 al 17 % en 37 minutos, seguido de un aumento al 25 % B en 15 minutos y luego al 35 % en 8 minutos, seguido de un paso de lavado al 85 % B y reequilibrio.

#### **5.7.4.- Espectrómetro de masas TIMS-TOF Pro.**

Las muestras de todas las fracciones se analizaron en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (MS) de cuadrupolo de espectrometría de movilidad de iones atrapados (TIMS) híbrido (TIMS-TOF Pro, Bruker Daltonics) a través de una fuente de iones de nanoelectrospray CaptiveSpray. El MS se hizo funcionar en modo dependiente de datos para la generación de la biblioteca espectral mejorada con movilidad de iones. Estableciendo la acumulación y el tiempo de rampa en 100 ms cada uno y registramos espectros de masas en el rango de 100–1700 m/z en modo de electrospray positivo. La movilidad de iones se escaneó de 0,6 a 1,6 Vs/cm<sup>2</sup>. El ciclo de adquisición general de 1,16 segundos comprendió una exploración completa de TIMS-MS y 10 exploraciones de MS/MS de fragmentación en serie de acumulación paralela (PASEF).

Para realizar DIA, definimos ventanas de aislamiento de cuadrupolo como una función del tiempo de exploración TIMS para lograr rampas sincrónicas y sin interrupciones para todos los voltajes aplicados. Definimos hasta 16 ventanas para exploraciones TIMS individuales de 100 ms de acuerdo con el plano de movilidad de iones m/z.

### **5.7.5.- Búsqueda en base de datos y biblioteca espectral.**

Usamos la plataforma computacional FragPipe (versión 15) con MSFragger (Kong et al., 2017; Yu et al., 2020a) (versión 3.2), Philosopher (da Veiga Leprevost et al., 2020) (versión 3.4 .13) y componentes EasyPQP (<https://github.com/grosenberger/easypqp>; versión 0.1.9) para crear bibliotecas espectrales. La identificación de péptidos a partir de espectros de masas en tándem (MS/MS) se realizó utilizando el motor de búsqueda MSFragger, utilizando archivos sin procesar como entrada. Se utilizaron bases de datos de secuencias de proteínas H. sapiens (UP000005640) de UniProt (solo secuencias revisadas; descargadas el 15 de febrero de 2021) y proteínas contaminantes comunes, que contienen un total de 20421 secuencias (H. sapiens). Las secuencias de proteínas invertidas se agregaron a las bases de datos originales como señuelos. Para el análisis de MSFragger, las tolerancias de masa del precursor y del fragmento (inicial) se establecieron en 20 ppm. La especificidad de la enzima se estableció en "tripsina estricta" y se permitieron péptidos totalmente enzimáticos. Se permitieron hasta dos escisiones de tripsina perdidas. La oxidación de metionina, la acetilación de la proteína N-terminal, -18,0106 Da en ácido glutámico N-terminal y -17,0265 Da en glutamina y cisteína N-terminal se estableció como modificaciones variables.

Para la configuración DIA-NN y procesamiento de datos dia-PASEF se utilizó DIA-NN 1.7.15 para los puntos de referencia y se operó con tolerancias máximas

de precisión de masa establecidas en un promedio predeterminado de 13 ppm para los espectros MS1 y MS2.

#### **5.7.6.- Análisis bioinformático.**

Los informes de salida de cuantificación de DIA-NN se exportaron y procesaron en el entorno estadístico R (RStudio Team, 2020). Los valores de intensidad para cada carrera se normalizaron ajustando las medianas. Los valores faltantes se imputaron para cada condición utilizando el algoritmo missforest (Stekhoven & Bühlmann, 2012). La expresión diferencial significativa de proteínas se determinó a través de una prueba t basada en Bayes (Smyth, 2004). Cualquier proteína asociada con un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativa. El análisis exploratorio como la reducción dimensional y la visualización de datos se crearon usando R v.3.6.0 con EnhancedVolcano (Blighe et al., 2018), ComplexHeatmap v.2.0.0 (Gu et al., 2016), Rtsne (Krijthe, 2015) y paquetes de base.

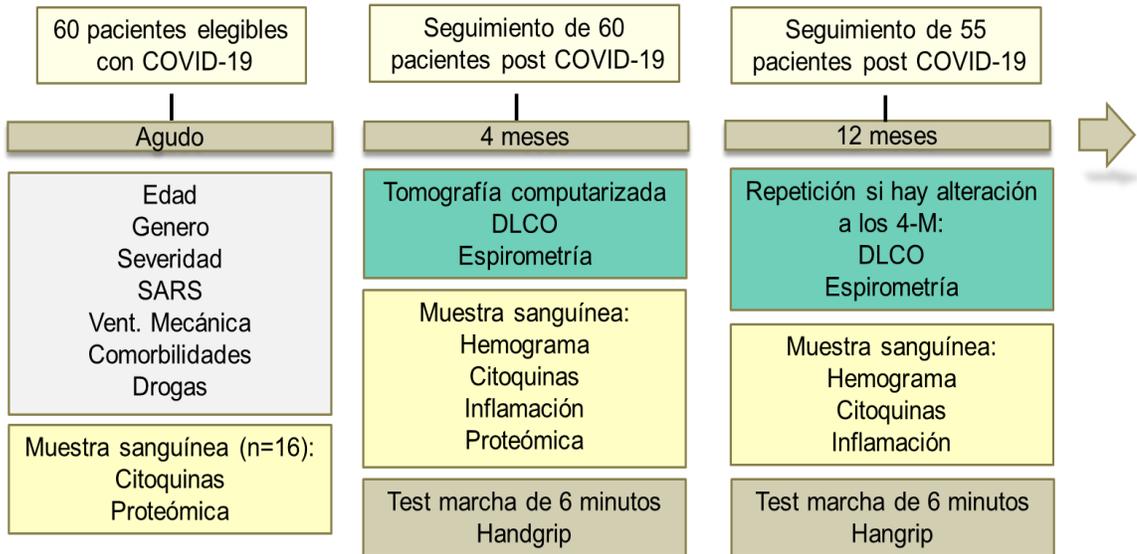
## 6. RESULTADOS

### Objetivo específico 1.

Determinar las secuelas pulmonares estructurales y funcionales a los 4 y 12 meses post infección en pacientes recuperados de COVID-19.

### 6.1) Análisis de data obtenida en reclutamiento 1.

Pasados 4 meses desde el diagnóstico de la patología, entre agosto y noviembre de 2020 (Reclutamiento 1), se comenzaron a reclutar a los pacientes del grupo de estudio. Aquí, se realizaron ciertos exámenes que evaluaron la condición pulmonar mediante DLCO y TCT, además de realizar una evaluación física del grupo en estudio mediante los test de espirometría, marcha de 6 minutos (TM6M) y *handgrip strength* (HGS). También, se aplicaron en los pacientes una serie de preguntas con la finalidad de obtener datos demográficos tales como la edad, sexo, grupo sanguíneo y comorbilidades previas a la COVID-19. Por último, de todos los pacientes se obtuvo una muestra sanguínea con la cual es posible cuantificar diferentes parámetros sanguíneos. Todo con la finalidad de repetir algunas de estas mediciones 12 meses post COVID-19 en un segundo reclutamiento (**Figura 14**).



**FIGURA 14. Línea de tiempo de trabajo.**

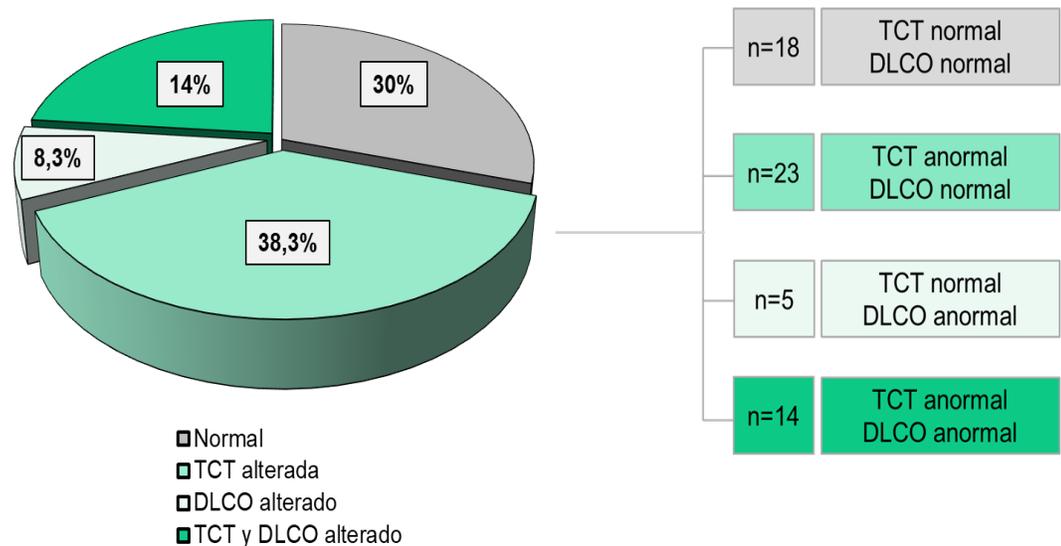
Resumen de las actividades y datos recopilados del grupo en estudio durante un año, dividiendo el trabajo en tres tiempos (Agudo, 4 meses y 12 meses post COVID-19).

### **6.1.1) Clasificación de pacientes según sus secuelas pulmonares.**

Las tomografías computarizadas de tórax nos permiten obtener una imagen en tres dimensiones que denota la extensión del pulmón afectado por la alta cantidad de componentes inflamatorios liberados en esta zona durante la infección por SARS-CoV-2. Las imágenes son evaluadas asignando un puntaje (TSS), el cual será proporcional al área pulmonar afectada. El test DLCO nos indica la funcionalidad del pulmón durante la etapa de recuperación de los pacientes evaluando el contacto de los alveolos con el lecho capilar y por lo tanto la funcionalidad de este intercambio gaseoso, determinando una disminución en la funcionalidad pulmonar si el resultado es menor al 80%.

Mediante el resultado de estos exámenes pulmonares fue posible realizar una clasificación de los pacientes como secuelados según la presencia por si sola de un examen alterado de TCT con  $TSS \geq 1$  o un examen alterado de DLCO con un resultado de funcionalidad menor al 80%. Mientras que fueron clasificados como severamente secuelados o con DPLP aquellos pacientes que presentan al mismo tiempo un examen de TCT y DLCO alterado durante el periodo de recuperación. La alteración de ambos exámenes, según varios estudios dan cuenta de una problemática respiratoria mayor, al estar afectado con focos inflamatorios la estructura pulmonar y al mismo tiempo presentar una disminución en la funcionalidad del intercambio gaseoso que se realiza en la barrera alveolo capilar (Bazdyrev et al., 2021; S. Zhang et al., 2021).

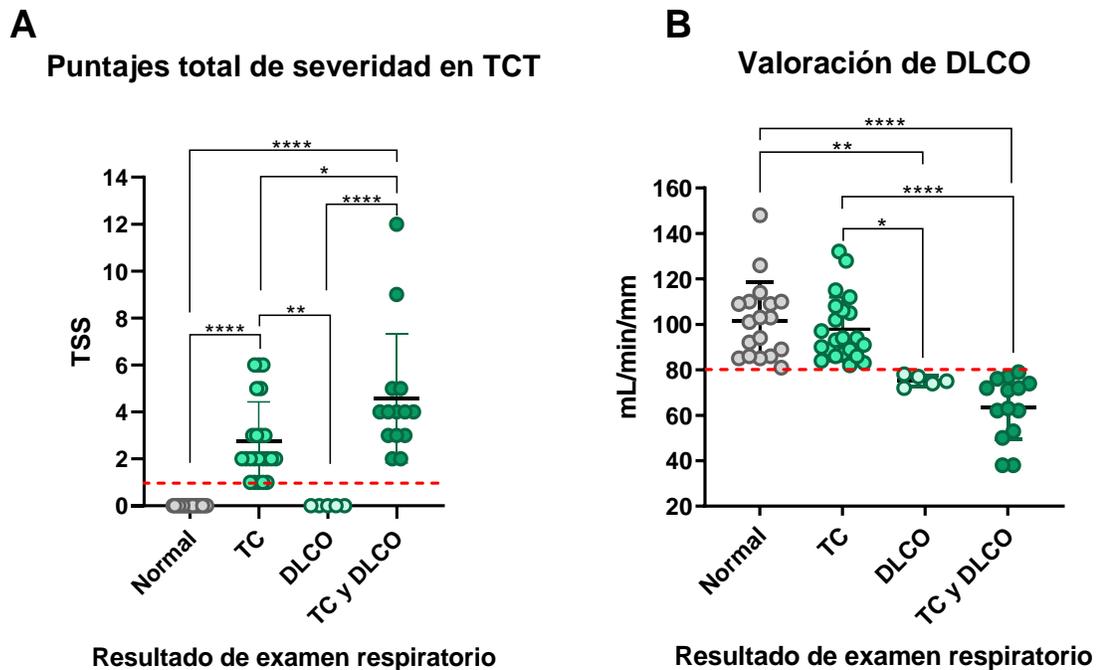
Según el criterio antes mencionado se dividió al grupo en estudio compuesto por 60 pacientes que participaron en el reclutamiento 1 clasificándose a 18 de estos pacientes (30%) como grupo normal al no presentar exámenes respiratorios alterados 4 meses post COVID-19, otros 23 pacientes (38,3%) fueron catalogados como secueledos al presentar por sí solo el examen de TCT alterado, misma categorización que recae en los 5 pacientes (8,3%) que presentaron por sí solo el examen de DLCO alterado, mientras que los 14 pacientes restantes (23,3%) fueron catalogados como grupo severamente secueledos al presentar al mismo tiempo un examen de TCT y DLCO alterado durante el reclutamiento 1 (**Figura 15**).



**FIGURA 15. Clasificación de secuelas según exámenes respiratorios pertenecientes al reclutamiento 1.**

Los pacientes fueron clasificados como secueledos a partir de los exámenes respiratorios obtenidos durante el reclutamiento 1 según la presencia por si sola de un examen alterado de TCT o un examen alterado de DLCO. Los pacientes con DPLP fueron categorizados según la presencia en conjunto de un examen alterado de TCT y DLCO. Por último, los pacientes que no presentaron alteraciones en los exámenes de DLCO o TCT 4 meses post COVID-19 son categorizados como normales. (Gráfico de torta).

Al estudiar por separado el resultado de los test DLCO y TCT con respecto a los 4 sub grupos formados gracias a la categorización de los 60 participantes fue posible identificar diferencias importantes. En las TCT fue posible realizar un análisis del TSS otorgado a cada imagen, si este TSS es igual o mayor a 1 se considera como alterada la TCT (**Figura 16-A**), además, a mayor TSS, mayor es la extensión del pulmón afectado visualizado por el médico. A partir de aquello, se detectó que el grupo con DPLP presentó un mayor promedio de TSS con respecto al grupo normal y a los grupos secueledos con TC o DLCO alterados por sí solo. Además, también se encontraron diferencias significativas entre el TSS del grupo que presenta TCT alterada por si sola con respecto al grupo normal o al grupo con DLCO alterado por sí solo. Por otra parte, al evaluar el valor de la difusión de monóxido de carbono a nivel pulmonar como resultado final del test DLCO (**Figura 16-B**), donde una difusión mayor al 80% es considerada como normal, se logró apreciar una disminución significativa del resultado de DLCO en el grupo con DPLP con respecto al grupo normal y al grupo con TCT alterada por si sola. Así mismo, el grupo con DLCO alterado por sí solo, también presentó una disminución significativa del resultado final del test con respecto al grupo normal y al grupo con TCT alterada por si sola.



**FIGURA 16. Análisis del resultado final de las TCT y el test DLCO.**

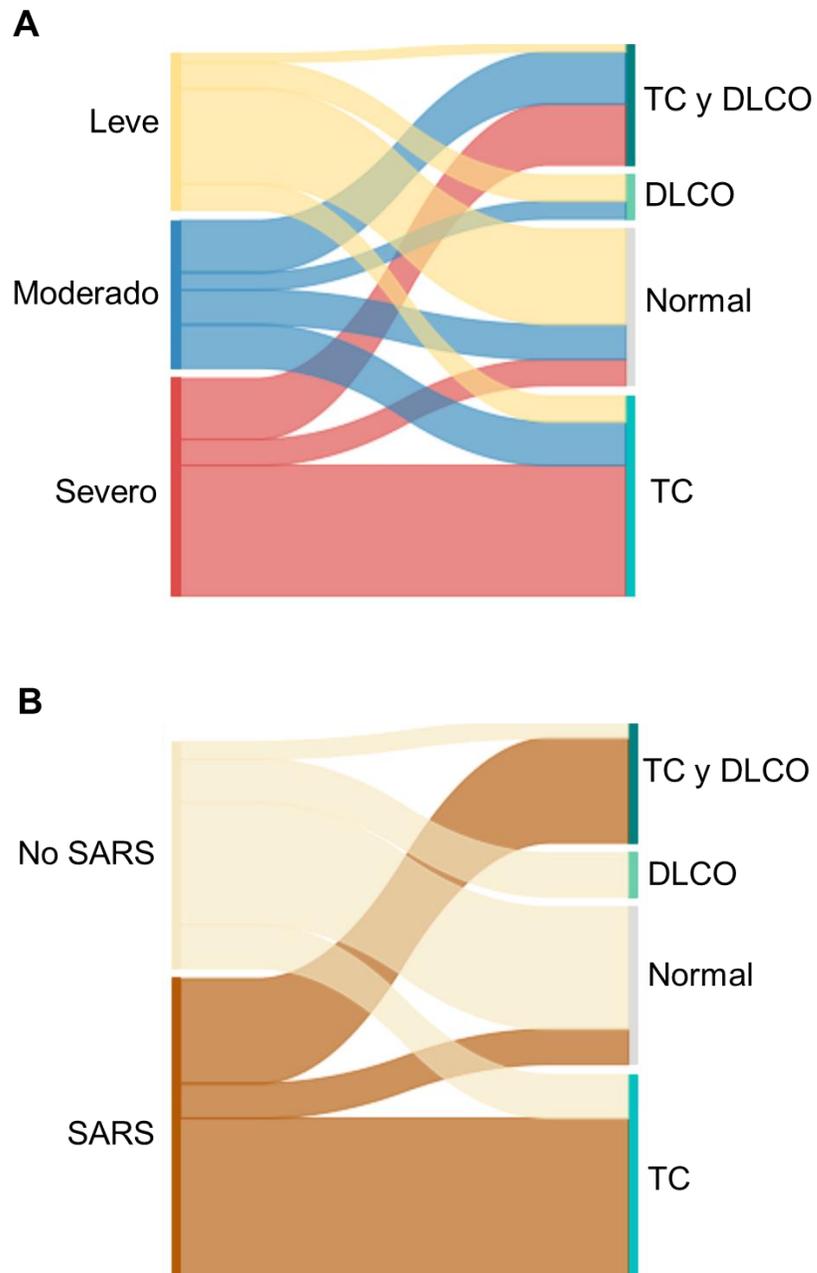
Análisis por separado de los exámenes que otorgan la clasificación al grupo en estudio según las secuelas pulmonares identificadas 4 meses post COVID-19. **A)** Estudio del TSS otorgado a las TCT en función de los 4 sub grupos formados según sus secuelas pulmonares. Un TSS mayor o igual a 1 decreta una TCT alterada. **B)** Análisis del resultado del test DLCO en función de los 4 sub grupos formados según sus secuelas pulmonares. Una difusión menor al 80% decreta un DLCO alterado. (Test ANOVA, Valor p: \*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0,001; \*\*\*\*<0,0001)

La problemática respiratoria post COVID-19 tiene como principal condicionante el desarrollo de una enfermedad severa con la presencia de neumonía por COVID-19 o SARS durante la etapa activa de la patología. Entre los 60 pacientes diagnosticados con una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) positiva entre los meses de Marzo y Agosto del año 2020, 18 personas desarrollaron la enfermedad levemente (sintomáticos, sin diagnóstico de neumonía o hipoxemia), mientras que otros 17 pacientes desarrollaron la patología en un nivel moderado (sintomáticos, con diagnóstico de neumonía que requirió hospitalización, sin conexión a ventilación mecánica invasiva (VMI)), donde 10 de ellos desarrollaron SARS. Por último, 25 pacientes manifestaron la COVID-19 de manera severa (hipoxemia severa, con necesidad de VMI y estaba en Unidad de cuidados intensivos (UCI), donde 24 de ellos desarrollaron SARS **(Tabla 2)**.

**TABLA 2. Características del grupo en estudio durante la etapa activa de la COVID-19.**

Gravedad COVID-19	N° pacientes	N° pacientes SARS
Leve	18	-
Moderado	17	10
Severo	25	24
TOTAL	60	34

Al estudiar la distribución de los datos correspondientes a la gravedad y la presencia de SARS durante la COVID-19 con respecto a la presencia de secuelas respiratorias identificadas durante el reclutamiento 1 fue posible reconocer que la gran mayoría de los pacientes que cursaron COVID-19 moderada o severa posteriormente presentan alterados sus exámenes de DLCO y TCT al mismo tiempo o su TCT por si sola (**Figura 17-A**). Específicamente son 7 de los 25 pacientes severos y 6 de los 17 pacientes moderados quienes 4 meses después manifiestan su TCT y DLCO alterados al mismo tiempo, mientras que son 15 de los 27 pacientes severos y 5 de los 18 pacientes moderados los que luego manifiestan su TCT alterada por si sola durante el reclutamiento 1. Por otra parte, en cuanto a los pacientes que desarrollaron neumonía por COVID-19 o SARS durante la etapa activa, la mayoría posteriormente pertenece al grupo con DPLP o al grupo con TCT alterada por si sola (**Figura 17-B**). Sin embargo, 4 de los 18 pacientes clasificados como normales presentaron SARS durante la etapa activa. Por otra parte, del grupo de pacientes secuelados se identifica que 18 de los 23 pacientes con TCT alterada presentaron SARS durante la etapa activa de la patología, mientras que ninguno de los 5 pacientes que presentó por sí solo DLCO alterado durante el reclutamiento 1 sufrió de SARS durante la etapa activa. Por último, 12 de los 14 pacientes clasificados por presentar una alteración de TCT y DLCO 4 meses post COVID-19 sufrieron SARS durante el periodo activo de la enfermedad.



**FIGURA 17. Distribución del grupo en estudio según severidad y desarrollo de SARS durante la etapa activa de COVID-19.**

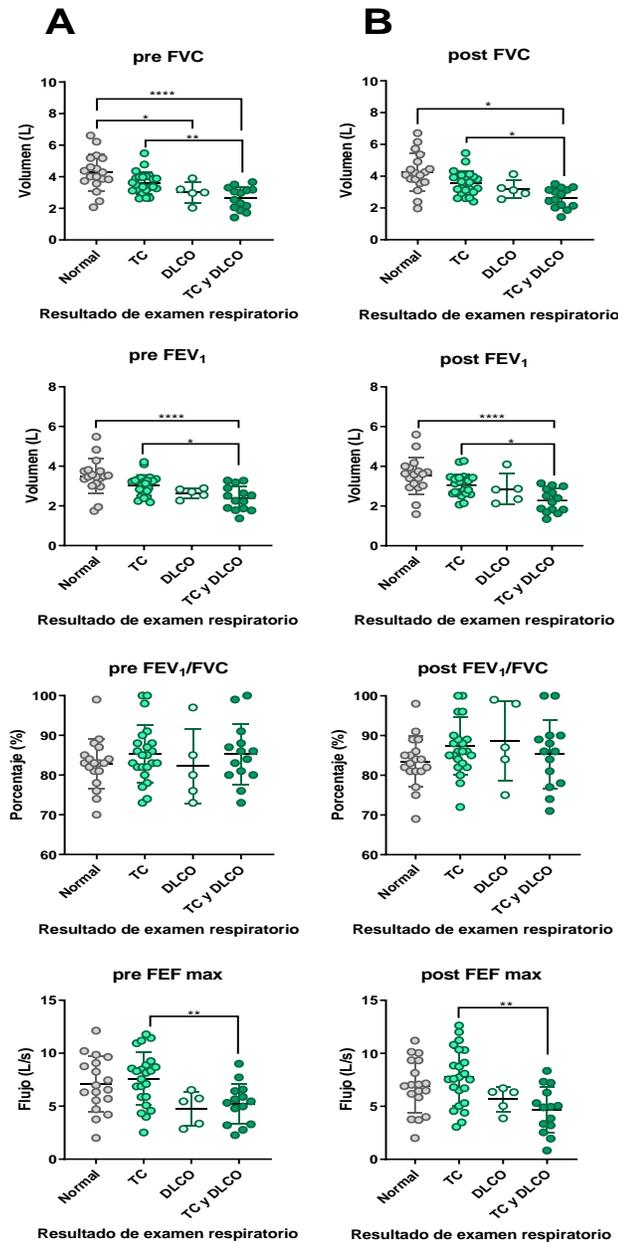
Análisis de la distribución de los pacientes en los 4 sub grupos formados por sus secuelas pulmonares identificadas 4 meses post COVID-19 según **(A)** la Severidad con la que manifestaron COVID-19 y **(B)** según el desarrollo o no del SARS durante la etapa activa de la enfermedad.

### **6.1.2) Evaluación de la condición física.**

Mediante una revisión física realizada por el grupo de kinesiólogos que componen el equipo de trabajo fue posible obtener información a partir de la realización de la espirometría, TM6M y HGS. Con ello fue posible identificar que el grupo de pacientes con DPLP presentó un mayor número de alteraciones en las pruebas que evaluaban su condición física a los 4 meses post-COVID-19 en comparación con pacientes sin secuelas o pacientes con TCT anormal solamente.

Comenzando por el test de espirometría, el cual mide la funcionalidad mecánica del pulmón y se compone por varios parámetros de carácter respiratorio evaluados previo y posterior al uso de broncodilatadores durante la ventilación. Éstos parámetros evaluados fueron la capacidad vital forzada (FVC), volumen espiratorio forzado en el primer segundo ( $FEV_1$ ), porcentaje de aire exhalado en primer segundo ( $FEV_1/FVC$ ) y flujo espiratorio máximo (FEF-max). El examen se identifica como alterado cuando la sumatoria de los parámetros evaluados resulta en una capacidad mecánica pulmonar menor al 70%. Entre los 60 participantes evaluados durante el reclutamiento 1, solo 10 participantes presentaron un resultado final de espirometría menor al 70%, distribuyéndose entre los 4 sub grupos con 2 participantes en el grupo normal, 5 en el grupo con TCT alterada por si sola y los últimos 3 individuos recaen en el grupo con DPLP. Luego, fueron evaluados de forma particular cada parámetro que compone la espirometría y

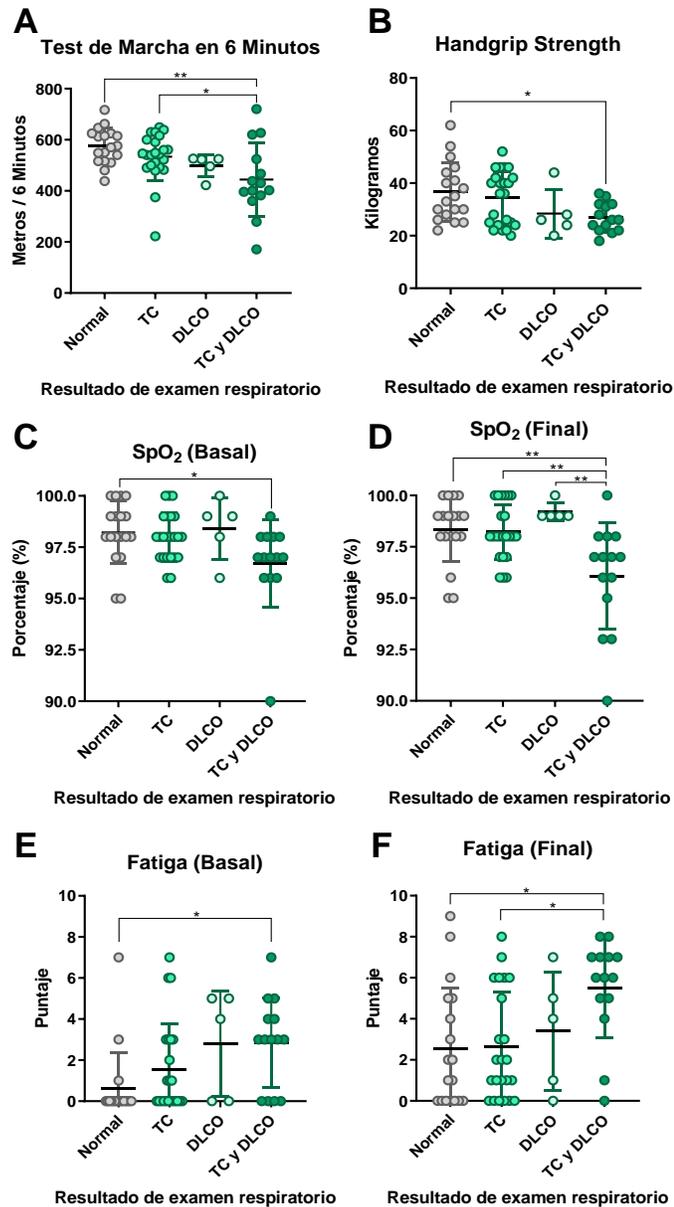
comparados sus resultados entre los 4 sub grupos de participantes, a partir de aquello fue posible identificar una mayor incidencia de parámetros alterados de la espirometría, con una disminución de carácter significativa en FVC, FEV<sub>1</sub> y FEF-max en el grupo con DPLP en comparación al grupo normal o el grupo con TCT alterada por si sola (**Figura 18**).



**FIGURA 18. Parámetros evaluados de la espirometría a los 4 meses con respecto a la categorización del grupo en estudio.**

Los parámetros FVC, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC y FEF-max que componen la espirometría fueron evaluados (A) pre y (B) post broncodilatación 4 meses posterior a la etapa aguda de la COVID-19 en los 60 pacientes que componen el grupo en estudio, siendo comparados los resultados de estos parámetros entre los cuatro subgrupos categorizados según las secuelas pulmonares de los pacientes. (Test ANOVA, Valor p: \*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0,001; \*\*\*\*<0,0001)

La alteración de parámetros en el grupo con DPLP en comparación al grupo normal o el grupo con TCT alterada por si sola también se extiende al analizar los resultados del TM6M o el HGS en los pacientes (**Figura 19**). Aquí es posible observar que la cantidad de metros recorridos en 6 minutos y la fuerza ejercida por la mano del paciente es significativamente menor en el grupo con DPLP. Además, como información adicional al TM6M, se registró previo y posterior al ejercicio la saturación arterial de oxígeno ( $SpO_2$ ) y la escala de fatiga, siendo posible identificar que previo al ejercicio el grupo con DPLP presentó una menor  $SpO_2$  y una mayor fatiga en comparación al grupo normal. Esta diferencia aumentó posterior al ejercicio, provocando que el grupo con DPLP presente diferencias significativas no solo con el grupo normal, sino que también con los grupos que presentan TCT alterada o DLCO alterado.



**FIGURA 19. Evaluación del TM6M, HGS, SpO<sub>2</sub> y escala de fatiga a los 4 meses con respecto a la categorización del grupo en estudio.**

Los resultados del **(A)** TM6M y el **(B)** HGS fueron parte de la evaluación física de los pacientes 4 meses posterior a la etapa aguda de la COVID-19. Los resultados de estos exámenes fueron comparados entre los cuatro subgrupos categorizados según las secuelas pulmonares que presentan, al igual que la **(C - D)** SpO<sub>2</sub> y la **(E - F)** escala de fatiga registrada previa y posterior a la realización del TM6M. (Test ANOVA, Valor p: \* < 0.05; \*\* < 0.01)

### 6.1.3) Análisis de datos demográficos.

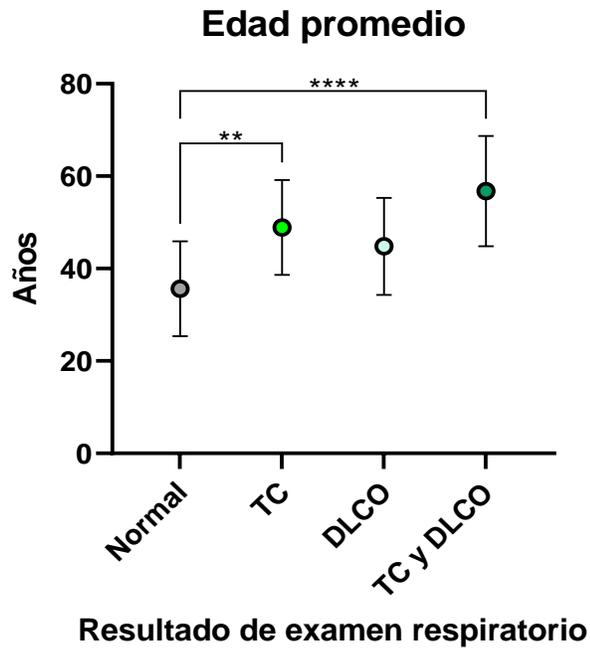
La edad, el sexo, el grupo sanguíneo y las comorbilidades previas a la COVID-19 en el grupo en estudio fueron parámetros demográficos analizados como punto de comparación entre los diferentes grupos categorizados según sus secuelas pulmonares. A partir de esta información se logró determinar que el género (femenino/masculino) de los participantes presenta una distribución bastante homogénea entre cada grupo siendo 28 mujeres y 32 hombres en total. Un 25% del sexo femenino se ubica dentro del grupo normal que no presenta alteraciones en sus exámenes respiratorios; otro 14.3% se ubica dentro del grupo secuelado que presenta solo el test DLCO alterado; un 32,1% se encuentra dentro del grupo secuelado que presenta solo la TCT alterada; y finalmente el 28,6% restante se mantiene dentro del grupo categorizado como severamente secuelado al presentar DLCO y TCT alterados. Mientras que el sexo masculino se ubicó con un 34.4% dentro del grupo normal; otro 3.1% se encuentra dentro del grupo secuelado por DLCO alterado; un 43.8% se encuentra dentro del grupo secuelado por TCT alterada; y el 18.7% restante se mantiene categorizado dentro del grupo severamente secuelado con DLCO y TCT alterados (**Tabla 3**). La edad de los pacientes presentó en promedio valores que aumentaron conforme aumentaban las secuelas pulmonares de los pacientes, siendo 35.6 años la edad promedio entre el grupo normal; 44.8 años para el grupo secuelado por DLCO alterado; 48.9 años para el grupo secuelado por TCT alterado; y 56.8 años para

el grupo severamente secuelado. Mientras que la edad promedio del grupo en estudio en general es de 46.4 años (**Tabla 3**).

**TABLA 3. Tabla de contingencia del grupo en estudio según sus secuelas pulmonares, edad promedio y sexo.**

<b>Categorización de pacientes</b>	<b>Edad promedio (SD), (Rango)</b>	<b>Sexo femenino (%)</b>	<b>Sexo masculino (%)</b>
Normal	35.6 (±10.3), (20-60)	7 (25%)	11 (34.4%)
TCT	48.9 (±10.3), (33-64)	9 (32.1%)	14 (43.8%)
DLCO	44.8 (±10.5), (33-61)	4 (14.3%)	1 (3.1%)
TCT y DLCO	56.8 (±11.9), (27-74)	8 (28.6%)	6 (18.7%)
<b>TOTAL</b>	<b>46.4</b> <b>(±13.1) (20-74)</b>	<b>28</b> <b>(100%)</b>	<b>32</b> <b>(100%)</b>

Al tomar las edades promedio de cada grupo categorizados según sus secuelas pulmonares y compararlas estadísticamente (**Figura 20**) fue posible determinar que la edad promedio del grupo severamente secuelado es significativamente mayor a la edad promedio que presenta el grupo normal. También fue posible determinar que la edad promedio del grupo secuelado por presentar TCT alterada es significativamente mayor a la edad que presenta el grupo normal.



**FIGURA 20. Diferencias entre las edades promedios del grupo en estudio.**

Análisis estadístico mediante test ANOVA entre los diferentes grupos categorizados según sus resultados en los exámenes respiratorios con respecto a las edades promedio de cada grupo. (Test ANOVA, Valor p: \*\*<0.01; \*\*\*\*<0,0001)

Al analizar los datos que respectan al grupo sanguíneo ABO de los pacientes y compararlos estadísticamente según la categorización del grupo en estudio por sus secuelas pulmonares es posible determinar que no existen diferencias significativas en el grupo sanguíneo ABO de los pacientes con respecto a su distribución según las secuelas pulmonares (**Tabla 4**).

**TABLA 4. Tabla de contingencia del grupo sanguíneo ABO según la categorización del grupo en estudio por sus secuelas pulmonares.**

<b>Grupo sanguíneo ABO</b>	<b>Normal</b>	<b>DLCO</b>	<b>TCT</b>	<b>TCT y DLCO</b>
A (%)	3 (16,7)	2 (40)	5 (21,7)	4 (28,6)
B (%)	2 (11,1)	1 (20)	1 (4,3)	2 (14,3)
AB (%)	0 (0)	0 (0)	2 (8,7)	0 (0)
O (%)	13 (72,2)	2 (40)	15 (65,2)	8 (57,1)
<b>TOTAL (%)</b>	<b>18 (100)</b>	<b>5 (100)</b>	<b>23 (100)</b>	<b>14 (100)</b>

Por último, se analizaron las comorbilidades previas a la COVID-19 presentes entre los pacientes que componen el grupo en estudio, las cuales fueron informadas por los propios pacientes a través de encuestas realizadas a ellos durante el reclutamiento 1. De entre las enfermedades consultadas a los pacientes (**Tabla 5**) son la hipertensión arterial y la insulino resistencia las comorbilidades previas con mayor incidencia y que manifiestan una diferencia significativa entre el grupo con DPLP frente a los demás participantes, seguido por la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad del hígado graso no alcohólico, en este caso sin diferencias significativas. Además, se identificó que 9 de los 14 (64.3%) pacientes que componen el grupo con DPLP presentaron algún tipo de comorbilidad previa a la COVID-19, seguido por el grupo secuelado que presenta TCT alterada con 14 de sus 23 integrantes (60.9%) padeciendo una comorbilidad previa a la COVID-19 y por el grupo secuelado que presenta DLCO alterado con 2 de 5 de sus integrantes (40%) informando una comorbilidad previa a la COVID-19, finalmente, el grupo normal presentó a 6 de 18 pacientes (33.3%) con alguna comorbilidad previa a la COVID-19.

**TABLA 5. Comorbilidades previas a COVID-19 en el grupo en estudio dividido según sus secuelas pulmonares.**

Comorbilidad es previas a COVID-19	Normal	TC	DLCO	TC y DLCO	N° Total de afectados por patología	p-value
Hipertensión arterial (%)	4/18 (22.2)	7/23 (30.4)	0/5 (0)	9/14 (64.3)	20	*<0,020
Insulino resistencia (%)	0/18 (0)	5/23 (21.7)	0/5 (0)	6/14 (42.9)	11	*<0,012
DMT2 (%)	1/18 (5.6)	4/23 (17.4)	0/5 (0)	3/14 (21.4)	8	n.s.
Insuficiencia cardíaca (%)	0/18 (0)	0/23 (0)	0/5 (0)	0/14 (0)	0	-
EPOC (%)	0/18 (0)	0/23 (0)	0/5 (0)	0/14 (0)	0	-
Cáncer (%)	0/18 (0)	0/23 (0)	0/5 (0)	1/14 (7.1)	1	n.s.
IRC (%)	0/18 (0)	0/23 (0)	0/5 (0)	0/14 (0)	0	-
FA (%)	0/18 (0)	0/23 (0)	0/5 (0)	1/14 (7.1)	1	n.s.
Derrame cerebral (%)	0/18 (0)	0/23 (0)	0/5 (0)	1/14 (7.1)	1	n.s.
ECD (%)	0/18 (0)	0/23 (0)	0/5 (0)	0/14 (0)	0	-
EHGNA (%)	2/18 (11.1)	1/23 (4.3)	1/5 (20)	3/14 (21.4)	7	n.s.
Hipotiroidismo (%)	0/18 (0)	2/23 (8.7)	1/5 (20)	2/14 (14.3)	5	n.s.
N° Total de afectados por grupo (%)	6/18 (33.3)	14/23 (60.9)	2/5 (40)	9/14 (64.3)	-	-

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2; EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; IRC: Insuficiencia renal crónica; FA: Fibrilación auricular; ECD: Enfermedad cardíaca crónica; EHGNA: Enfermedad del hígado graso no alcohólico; n.s: No significativo. (Tabla de contingencia, Valor p: \*<0.05).

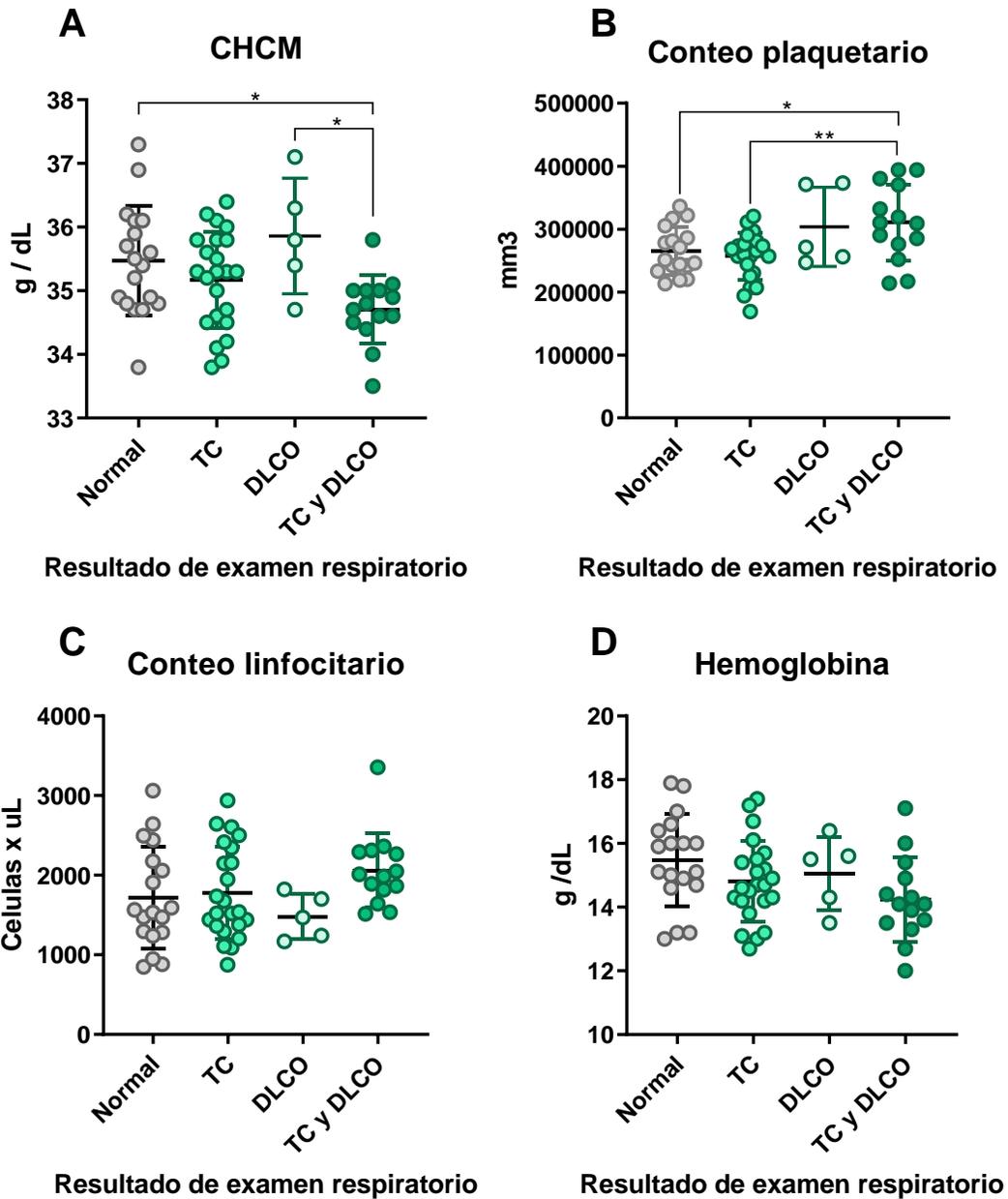
#### **6.1.4) Análisis de recuento celular.**

Gracias a la toma de muestras sanguíneas durante el reclutamiento 1 fue posible obtener un perfil hematológico completo de los 60 participantes. A partir de esto se compararon los diferentes parámetros sanguíneos evaluados entre los 4 subgrupos clasificados según sus secuelas respiratorias (**Tabla 6**), encontrando diferencias significativas en la concentración de la hemoglobina corpuscular media (CHCM) y en el conteo plaquetario. Esta diferencia se produce por una disminución de la CHCM en el grupo con DPLP en comparación al grupo normal y al grupo con DLCO alterado por sí solo (**Figura 21-A**), mientras que en el recuento plaquetario la diferencia se produce por un aumento de este parámetro en el grupo con DPLP en comparación al grupo normal y al grupo con TCT alterada por si sola (**Figura 21-B**). No existieron diferencias significativas en los otros parámetros evaluados, pero si existe una tendencia al aumento o disminución de los indicadores sanguíneos en el grupo con DPLP con respecto al grupo normal, por ejemplo, se presenta una tendencia hacia el aumento en el conteo de células blancas, específicamente leucocitos, en el grupo con DPLP en comparación al grupo normal (**Figura 21-C**), así mismo, se evidencia una disminución en la cantidad de hemoglobina presente en el grupo con DPLP en comparación al grupo normal (**Figura 21-D**).

**TABLA 6. Parámetros del hemograma comparados entre los participantes divididos por sus secuelas pulmonares.**

Hemograma	Normal	TC	DLCO	TC y DLCO	p-value
Hematocrito (%), (SD)	43,6±3,6	42,1±3,2	42,0±2,7	41,0±3,8	n.s.
Hemoglobina (g/dL), (SD)	15,5±1,4	15,0±1,3	15,1±1,2	14,2±1,3	n.s.
HCM (pg),(SD)	31,8±1,3	31,7±1,7	33,0±0,6	31,4±1,3	n.s.
CHCM (g/dL), (SD)	35,5±0,7	35,2±0,8	35,9±0,9	34,7±0,5	*<0,0120
VCM (fl), (SD)	89,8±3,7	90,1±4,5	92,0±2,3	149,5±221,8	n.s.
Plaquetas (x10 <sup>6</sup> /L), (SD)	277389 ±64142	256783 ±37183	303600 ±63030	310143 ±59864	*<0,0298
Leucocitos (x10 <sup>6</sup> /L), (SD)	5950±1271	5874±1672	5420±1756	6550±1455	n.s.
Linfocitos (x10 <sup>6</sup> /L), (SD)	1717±641	1778±580	1480±282	2063±464	n.s.
Linfocitos (%), (SD)	28,9±9,2	30,5±6,5	28,9±6,4	32,1±6,4	n.s.
Monocitos (x10 <sup>6</sup> /L), (SD)	366±116	374±164	294±75	402±147	n.s.
Monocitos (%), (SD)	6,2±1,6	6,6±2,8	5,6±1,3	6,1±1,2	n.s.
Granulocitos (x10 <sup>6</sup> /L), (SD)	3837±1013	3717±1283	3624±1515	4085±1136	n.s.
Granulocitos (%), (SD)	64,4±8,4	63,0±7,6	65,4±6,7	61,8±6,8	n.s.

HCM: hemoglobina corpuscular media; CHCM: concentración de hemoglobina corpuscular media; VCM: volumen corpuscular medio; SD: desviación estándar; n.s: No significativo. (Tabla de contingencia, Valor p: \*<0.05).



**FIGURA 21. CHCM, conteo plaquetario, conteo linfocitario y hemoglobina evaluados según la categorización del grupo en estudio.**

Análisis de parámetros que componen el hemograma realizado a los 60 participantes 4 meses post COVID-19 evaluados en función de los 4 sub grupos formados según sus secuelas pulmonares. **A)** CHCM. **B)** Conteo plaquetario. **C)** Conteo linfocitario. **D)** Hemoglobina. (Test ANOVA, Valor p: \* $<0.05$ ; \*\* $<0.01$ )

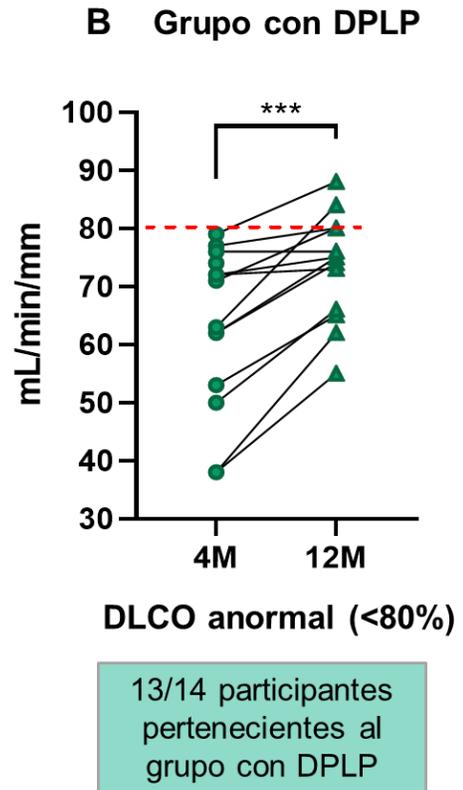
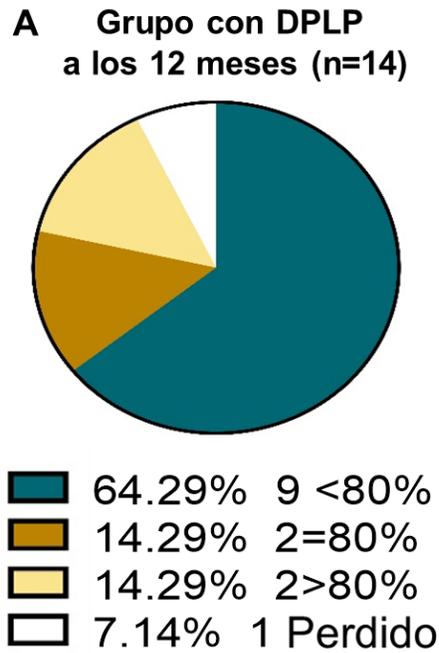
## **6.2) Análisis de data obtenida en reclutamiento 2.**

Al cabo de 12 meses tras el diagnóstico de la patología, entre abril y junio de 2021 (Reclutamiento 2), se recluta nuevamente al grupo en estudio con la finalidad de repetir el test DLCO en los pacientes que presentaron un resultado alterado de DLCO durante el reclutamiento 1. Además, se repitió la evaluación física mediante la ejecución de TM6M y HGS en todos los pacientes reclutados, mientras que el test de espirometría se repitió solo en aquellos pacientes que presentaron un resultado alterado de espirometría en el reclutamiento 1.

### **6.2.1) Repetición de test DLCO.**

Del grupo compuesto por 5 integrantes que presentaron por sí solo su examen de DLCO alterado durante el reclutamiento 1 se consiguió repetir el examen 12 meses post COVID-19 en solo 2 de ellos presentando ambos pacientes una mejora en el resultado con una funcionalidad pulmonar mayor al 80% .Por otra parte del grupo compuesto por 14 pacientes clasificado con DPLP según el resultado de sus exámenes respiratorios durante el reclutamiento 1, se logró durante el reclutamiento 2 repetir el examen de DLCO en 13 de ellos (**Figura 22-A**) logrando identificar una mejora significativa en el resultado del test DLCO obtenido por los pacientes durante el reclutamiento 2 en comparación al obtenido 4 meses luego de la infección viral (**Figura 22-B**), aun así, 9 de los 13 pacientes

mantienen alterado su examen de DLCO 12 meses post COVID-19 con un resultado menor a 80% en la funcionalidad pulmonar, mientras que de los 4 pacientes restantes, dos de ellos alcanzaron justamente un 80% de funcionalidad pulmonar y los otros dos superaron la barrera del 80% en su resultado de DLCO, consiguiendo recuperar en gran medida su funcionalidad pulmonar.

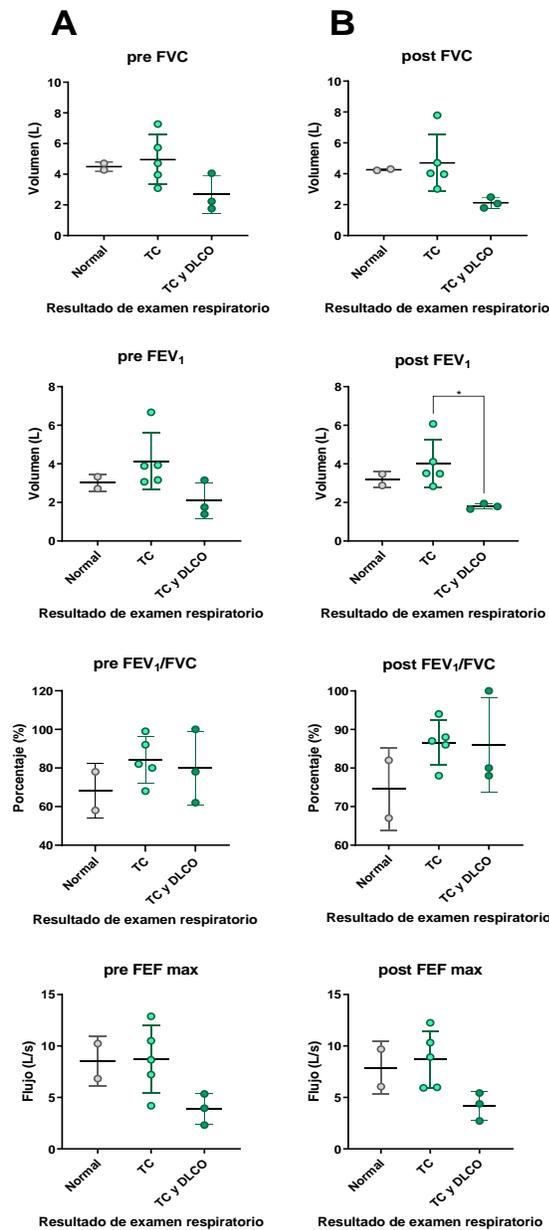


**FIGURA 22. Repetición de test DLCO en el grupo con DPLP.**

Resultados de la repetición del examen DLCO en 13 de los 14 pacientes pertenecientes al grupo con DPLP 12 meses post COVID-19. **A)** Distribución de los 14 pacientes con DPLP según el resultado de DLCO obtenido en el reclutamiento 2. **B)** Comparación del resultado en el test DLCO obtenido a los 4 y 12 meses posterior a la patología en 13 de los 14 pacientes con DPLP. (Grafico de torta **(A)**; T test **(B)**, Valor p: \*\*\*<0,001)

### **6.2.2) Repetición de evaluación de la condición física.**

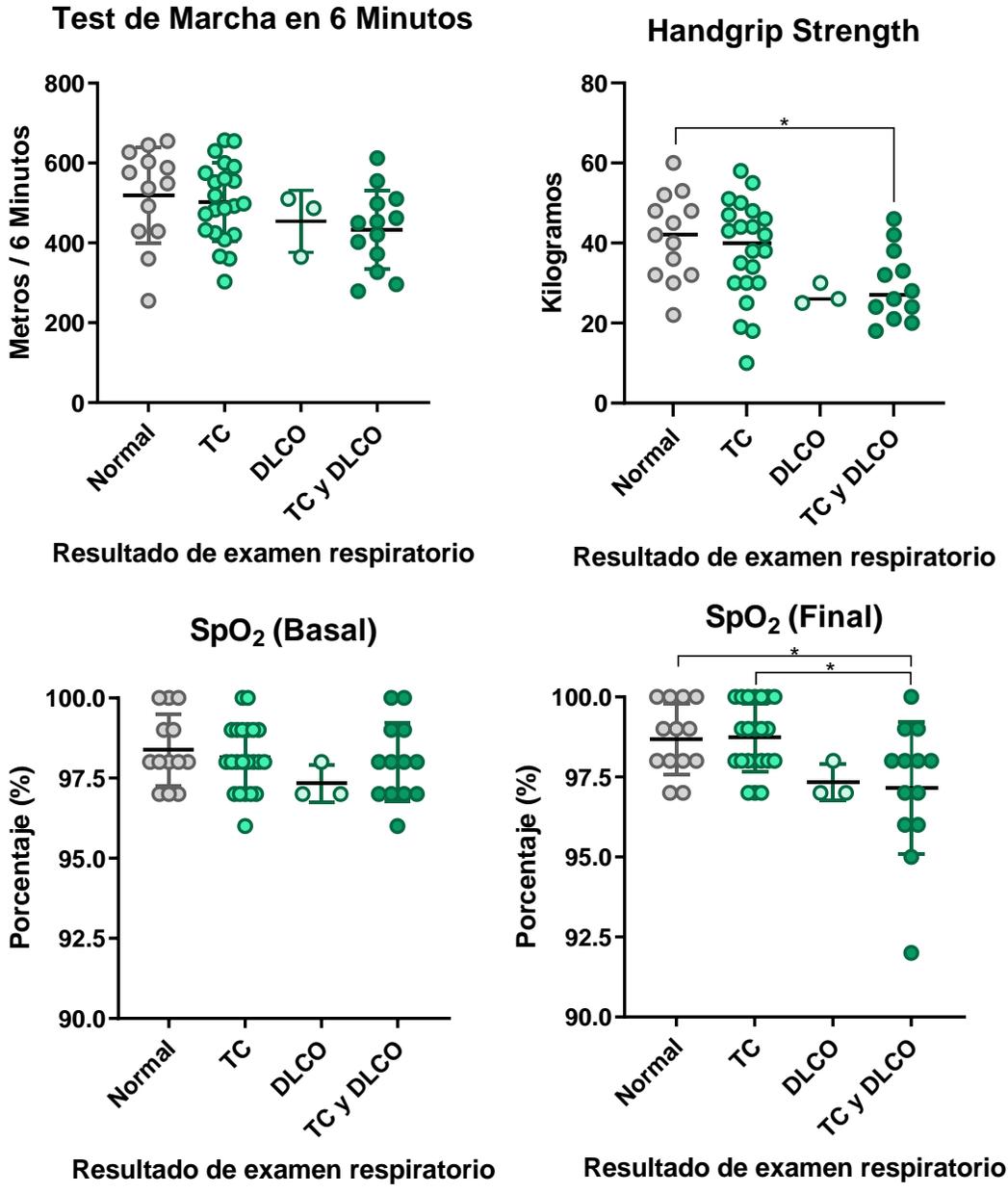
Al repetir el examen de espirometría en los 10 participantes que presentaron alterado su examen durante el reclutamiento 1 fue posible identificar que 2 de los 10 individuos mantiene disminuida su condición mecánica a nivel pulmonar con un resultado de espirometría menor al 70%, siendo ambos participantes pertenecientes al grupo con DPLP. Al comparar ahora individualmente los resultados de los distintos parámetros que componen la espirometría entre 3 de los 4 sub grupos clasificados por sus secuelas pulmonares, dejando fuera el grupo con DLCO alterado por sí solo ya que no existieron pacientes con espirometría alterada en este grupo durante el reclutamiento 1 (**Figura 23**). No fue posible identificar grandes diferencias. Puntualmente, se identificó una diferencia significativa al presentar el grupo con DPLP una menor FEV<sub>1</sub> post broncodilatación en comparación al grupo con TCT alterada por si sola.



**FIGURA 23. Parámetros evaluados de la espirometría a los 12 meses con respecto a la categorización del grupo en estudio.**

Los parámetros FVC, FEV<sub>1</sub>, FEV<sub>1</sub>/FVC y FEF-max que componen la espirometría fueron evaluados (A) pre y (B) post broncodilatación 12 meses posterior a la etapa aguda de la COVID-19 en los 10 pacientes que presentaron una espirometría alterada durante el reclutamiento 1, siendo comparados los resultados de estos parámetros entre 3 de los 4 subgrupos categorizados según las secuelas pulmonares de los pacientes. (Test ANOVA, Valor p: \* < 0.05)

Por otra parte, también fue posible repetir en todos los pacientes el TM6M y el test HGS durante el reclutamiento 2 (**Figura 24**). A partir de estos resultados fue posible identificar que no existieron diferencias significativas entre los 4 sub grupos en cuanto a la cantidad de metros recorridos en 6 minutos, algo diferente a lo que se observó en el resultado del HGS, donde se aprecia una disminución significativa de la fuerza aplicada por los pacientes con DPLP con respecto al grupo normal. Además, se logró registrar como dato adicional al TM6M la SpO<sub>2</sub> de los pacientes previo y posterior al ejercicio. Los resultados indican que, previo a la realización del test la SpO<sub>2</sub>, no presentó grandes diferencias entre los 4 sub grupos, a diferencia de lo que se identificó posterior al ejercicio donde la SpO<sub>2</sub> disminuyó de forma significativa en el grupo con DPLP en comparación al grupo normal y al grupo con TCT alterada por si sola.



**FIGRUA 24. Evaluación del TM6M, HGS y SpO<sub>2</sub> a los 12 meses con respecto a la categorización del grupo en estudio.**

La repetición del TM6M y el HGS son parte de la evaluación física realizada 12 meses posterior a la etapa aguda de la COVID-19. Los resultados de estos exámenes fueron comparados entre los cuatro subgrupos categorizados según las secuelas pulmonares que presentan, al igual que la SpO<sub>2</sub> registrada previa y posterior a la realización del TM6M. (Test ANOVA, Valor p: \*<0.05)

## **Objetivo específico 2.**

Determinar los niveles de citoquinas y quimioquinas en suero a los 4 y 12 meses post infección en pacientes recuperados de COVID-19.

### **6.3) Cuantificación de citoquinas.**

La cuantificación de citoquinas se realizó en muestras de suero obtenidas en tres tiempos diferentes. Se cuenta sólo con 16 muestras de suero de pacientes enfermos de forma moderada o severa obtenidas entre marzo y agosto de 2020 durante la etapa activa de la COVID-19. Luego, durante el reclutamiento 1 fue posible obtener 60 muestras de suero correspondientes a la etapa de recuperación 4 meses posterior al diagnóstico de la patología. Finalmente, durante el reclutamiento 2 fue posible obtener 55 muestras de suero pertenecientes al periodo de recuperación 12 meses posteriores al diagnóstico de la COVID-19. Además, se incluyó la cuantificación de estas citoquinas en grupos controles que no han padecido la patología confirmada, siendo 11 controles sanos para la cuantificación de citoquinas pertenecientes al periodo activo de la patología, 11 controles sanos para la cuantificación perteneciente al periodo de recuperación 4 meses post COVID-19 y 7 controles sanos para la cuantificación de citoquinas a los 12 meses posterior al diagnóstico de la patología.

### **6.3.1) Cuantificación de citoquinas del periodo activo de la COVID-19.**

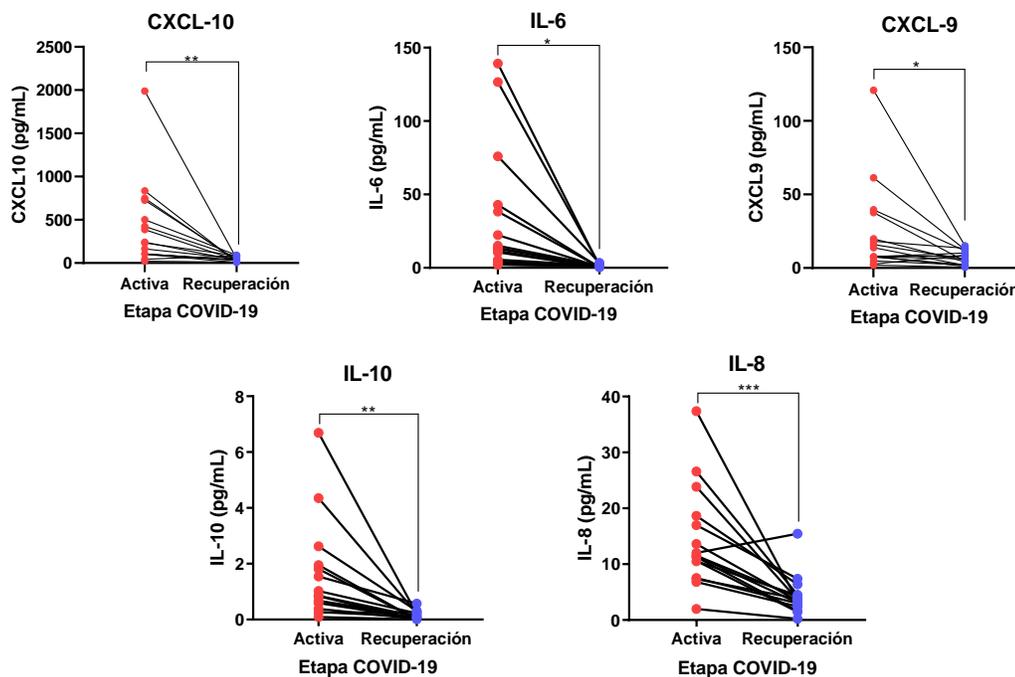
La cuantificación de citoquinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  y las quimioquinas CCL-2, CXCL-9 y CXCL-10 se realizó en muestras de suero obtenidas durante la etapa activa de la COVID-19 de 20 pacientes que componen el grupo de estudio.

Los 16 pacientes a quienes se les cuantificaron sus niveles de citoquinas padecieron la patología de manera severa o moderada, desarrollando todos el síndrome respiratorio agudo severo durante la COVID-19 y, además, todos presentaron algún tipo de secuela pulmonar 4 meses posterior a la etapa activa de la enfermedad, ya sea por una TCT alterada con TSS  $\geq 1$  o un resultado de DLCO menor al 80%.

Una vez obtenidos los resultados de la cuantificación de las muestras pertenecientes a la etapa activa se procede a comparar de forma pareada estos resultados con la cuantificación de las muestras de suero de estos pacientes obtenidas 4 meses posteriores al transcurso de la etapa activa de la enfermedad. Además, se incluyó en esta comparación la cuantificación de estas citoquinas en un grupo control de 11 personas que no padeció la patología.

Es así como, fue posible encontrar una disminución significativa de los niveles de quimioquinas como CXCL-10 o CXCL-9 y citoquinas como IL-8, IL-6 e IL-10 (**Figura 25**) en las muestras de los pacientes en la etapa de recuperación con

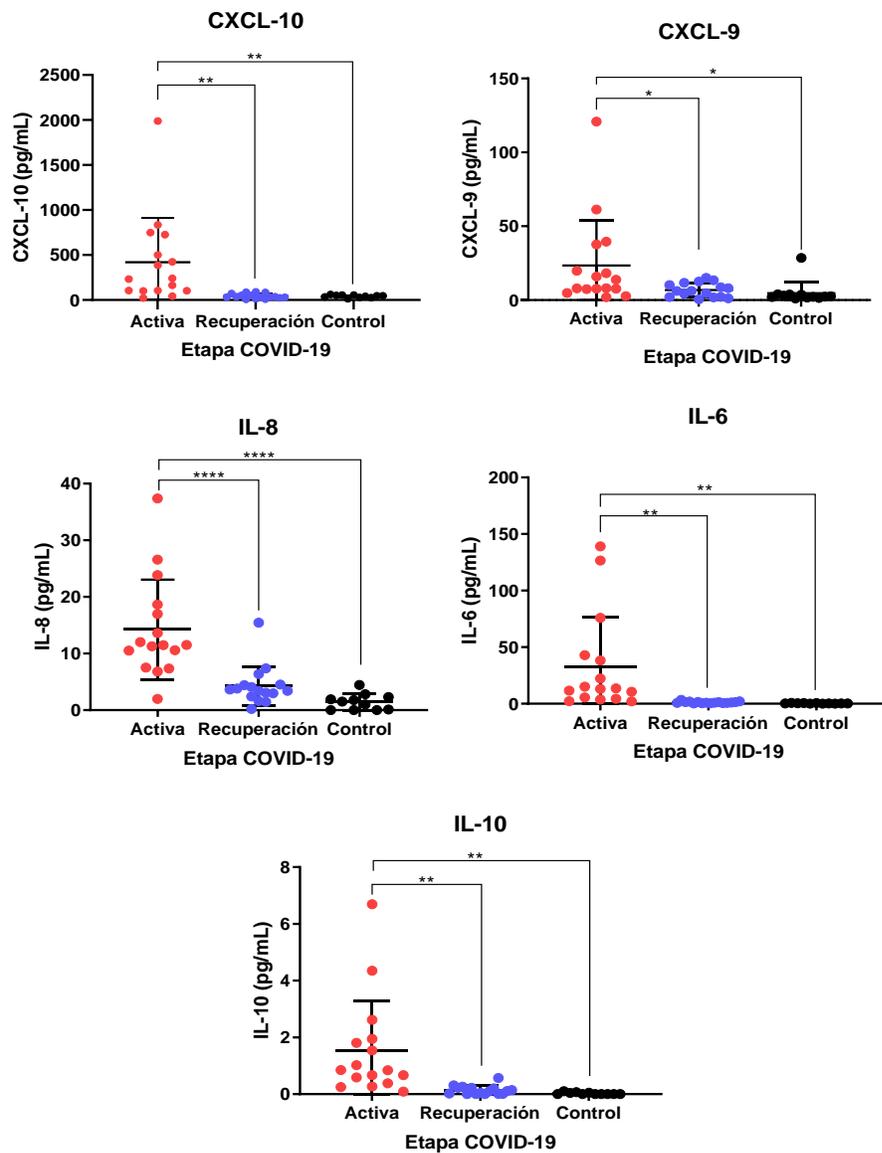
respecto a los niveles de las muestras pertenecientes a la etapa activa de la COVID-19.



**FIGURA 25. Comparación de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 entre etapa activa y de recuperación.**

Comparación estadística mediante T test con datos pareados entre las muestras de 16 pacientes durante la etapa activa de la patología y la etapa de recuperación (4 meses posteriores a la COVID-19). (T test, Valor p: \* < 0.05; \*\* < 0.01; \*\*\* < 0,001)

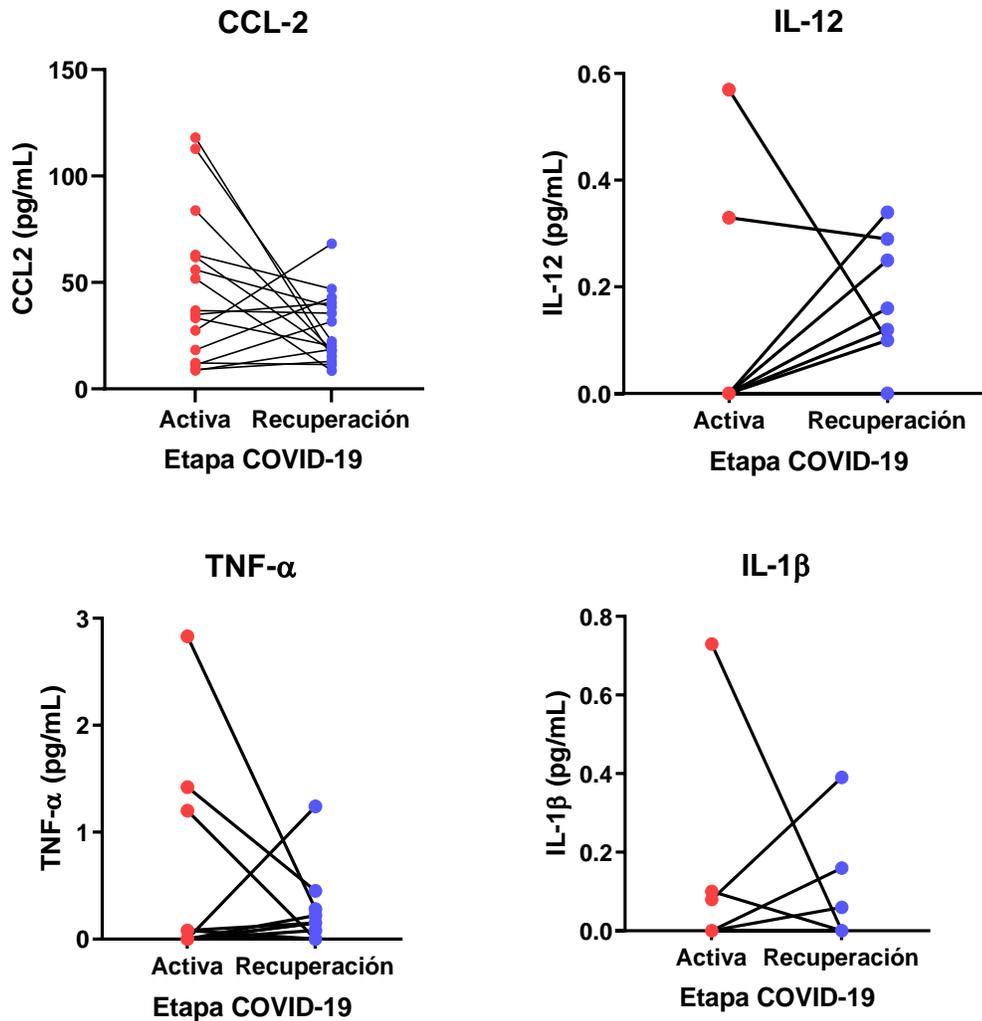
Además, esta disminución en las concentraciones de citoquinas como CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 en los pacientes que padecieron COVID-19 también se refleja al ser comparados con los niveles de citoquinas de los controles (**Figura 26**), donde no se aprecia una diferencia significativa entre los niveles de citoquinas en la etapa de recuperación con respecto a los niveles control.



**FIGURA 26. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 entre la etapa activa y de recuperación.**

Comparación mediante test ANOVA entre las muestras de 16 pacientes durante la etapa activa de la patología y la etapa de recuperación (4 meses posteriores a la COVID-19), además de los 11 pacientes control. (Test ANOVA, Valor p: \*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*\*<0,0001)

Por otra parte, se determinó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de citoquinas como IL-12, TNF, IL-1 $\beta$  y CCL-2 entre las muestras de suero pertenecientes a la etapa aguda y de recuperación (**Figura 27**). Estas citoquinas, pertenecientes a los 16 pacientes del grupo en estudio, tampoco presentaron alguna diferencia significativa al compararse los niveles control con los niveles en la etapa aguda ni en la etapa de recuperación.



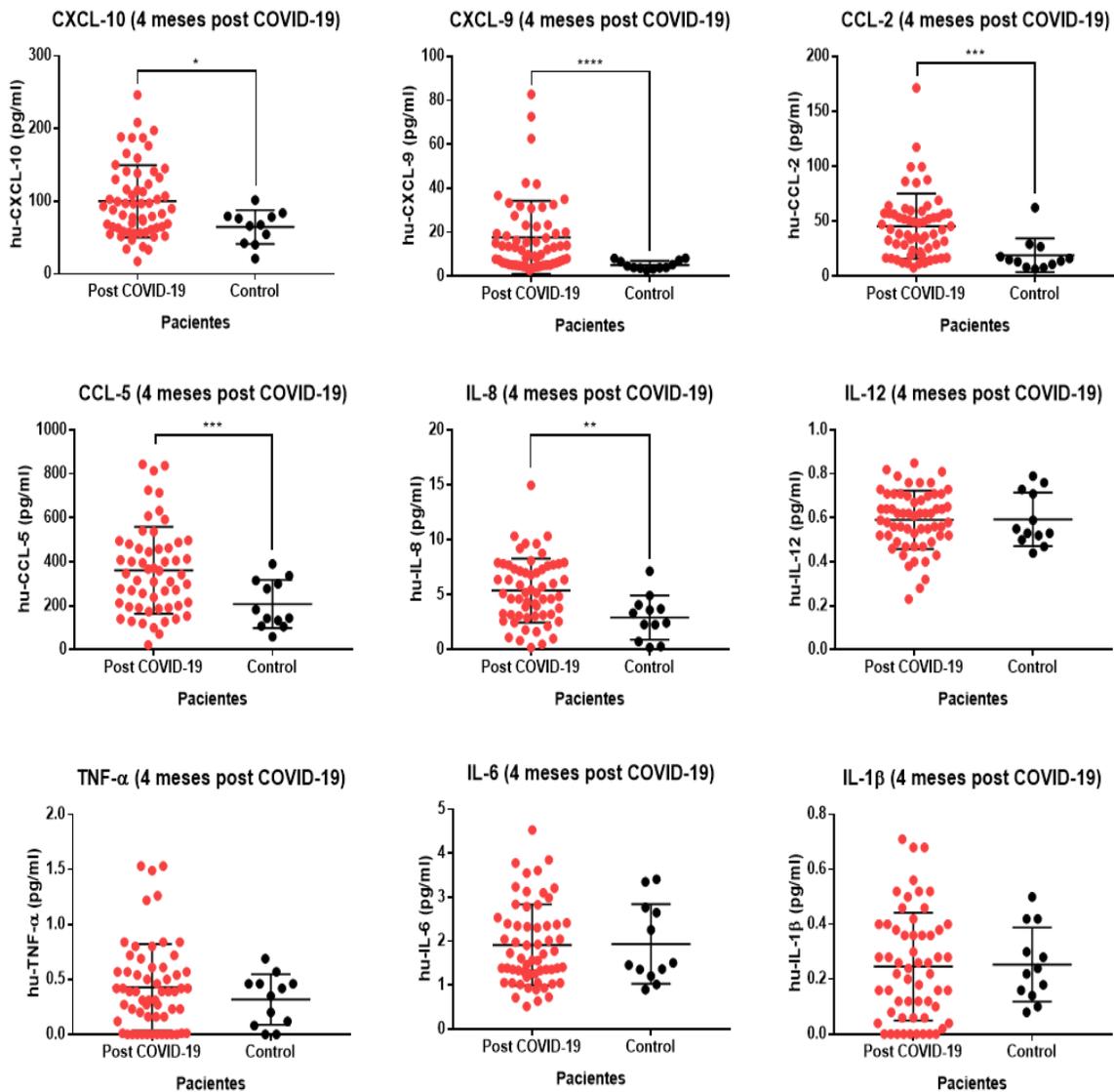
**FIGURA 27. Comparación de los niveles de IL-12, TNF, IL-1 $\beta$  y CCL-2 entre la etapa activa y de recuperación.**

Comparación estadística mediante T test con datos pareados entre las muestras de 16 pacientes durante la etapa activa de la patología y la etapa de recuperación (4 meses posteriores a la COVID-19).

### 6.2.2) Cuantificación de citoquinas 4 meses post COVID-19.

La cuantificación de citoquinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  y quimioquinas CCL-2 CCL-5, CXCL-9 y CXCL-10 se realizó en muestras de suero obtenidas durante el reclutamiento 1 pertenecientes a 60 pacientes. Además, se incluyó la cuantificación de estas citoquinas en un grupo control de 11 personas que no ha padeció la patología confirmada.

La cuantificación de las muestras de suero de estos pacientes 4 meses post COVID-19 fueron comparadas con las muestras obtenidas desde individuos control (**Figura 28**), a partir de aquello fue posible identificar que los niveles de citoquinas vuelven paulatinamente a valores que se encuentran dentro de los rangos normales, aun así, citoquinas como IL-8, CCL-2, CCL-5, CXCL-9 y CXCL-10 se encuentran significativamente altas en comparación al grupo control.



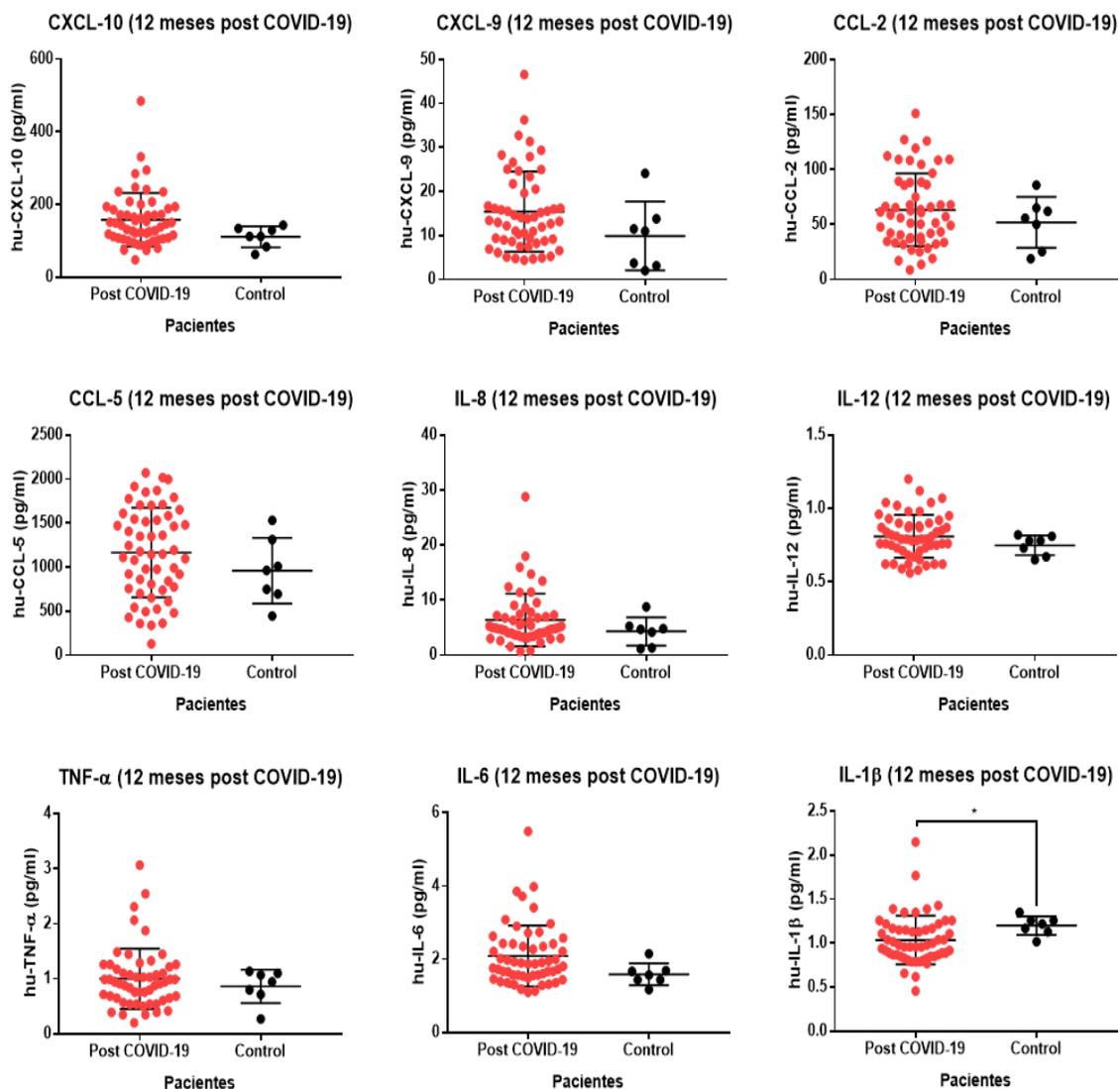
**FIGURA 28. Cuantificación de citoquinas pertenecientes al reclutamiento 1.**

Se realiza una comparación mediante T test con datos no pareados entre la cuantificación de las quimioquinas CXCL-10, CXCL-9, CCL-2, CCL-5 y las citoquinas IL-8, IL-12, TNF-α, IL-6 e IL-1β obtenidas en el reclutamiento 1 pertenecientes a 60 pacientes con respecto al grupo control compuesto por 12 individuos. (T test, Valor p: \*<0.05; \*\*<0.01; \*\*\*<0,001; \*\*\*\*<0,0001).

### **6.2.3) Cuantificación de citoquinas 12 meses post COVID-19.**

La cuantificación de citoquinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , CCL-2, CCL-5, CXCL-9 y CXCL-10 se realizó nuevamente en muestras de suero obtenidas durante el reclutamiento 2 correspondientes a 55 pacientes. Además, se incluyó la cuantificación de estas citoquinas en un grupo control de 7 personas que no ha padeció la patología confirmada.

La cuantificación de las muestras de suero de pacientes post COVID-19 fueron comparadas con los controles sanos (**Figura 29**), a partir de aquello fue posible identificar que los niveles de las citoquinas evaluadas no presentan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de pacientes 12 meses post-COVID-19 y los controles, a excepción de la citoquina IL-1 $\beta$ , la cual se encuentra significativamente más alta en los controles.



**FIGURA 29. Cuantificación de citoquinas pertenecientes al reclutamiento 2.**

Se realiza una comparación mediante T test con datos no pareados entre la cuantificación de las quimioquinas CXCL-10, CXCL-9, CCL-2, CCL-5 y las citoquinas IL-8, IL-12, TNF-α, IL-6 e IL-1β obtenidas en el reclutamiento 2 pertenecientes a 55 pacientes con respecto al grupo control compuesto por 7 individuos. (T test, Valor p: \* < 0.05)

### **Objetivo específico 3.**

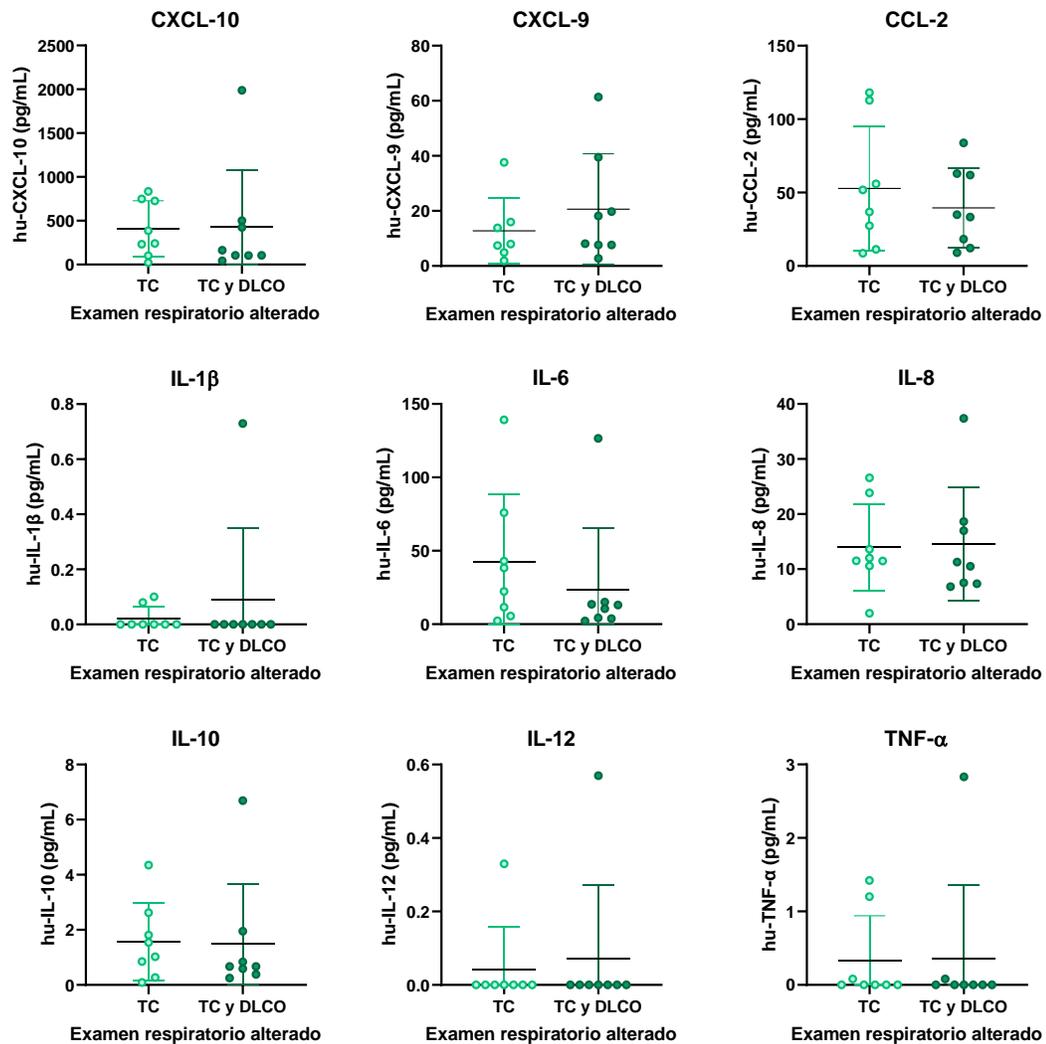
Comparar los niveles de citoquinas y quimioquinas circulantes entre pacientes recuperados de COVID-19 según sus secuelas pulmonares a los 4 y 12 meses post infección.

### **6.3) Comparación de citoquinas con secuelas pulmonares post COVID-19.**

Mediante la cuantificación de proteínas inflamatorias realizadas en los distintos reclutamientos fue posible comparar estos resultados según los 4 sub grupos formados a partir de la presencia alterada de los exámenes respiratorios TCT y/o DLCO realizados 4 meses post COVID-19.

#### **6.3.1) Secuela pulmonar y citoquinas pertenecientes a la etapa activa.**

A partir de las 16 muestras obtenidas durante la etapa activa de la COVID-19 fue posible realizar una división de ellas según la presencia alterada de los exámenes respiratorios realizados en estos participantes 4 meses posterior a esta toma de muestra. Es así como se clasificó que 8 de las 16 muestras pertenecían a pacientes que durante el reclutamiento 1 manifestaron su TCT alterada. Las otras 8 muestras pertenecían a integrantes del grupo con DPLP. Al comparar los niveles de citoquinas y quimioquinas de la etapa activa de estos individuos no fue posible reconocer diferencias significativas entre los pacientes que terminaron por manifestar una menor cantidad de exámenes alterados de los que se reconocen con una DPLP (**Figura 30**).

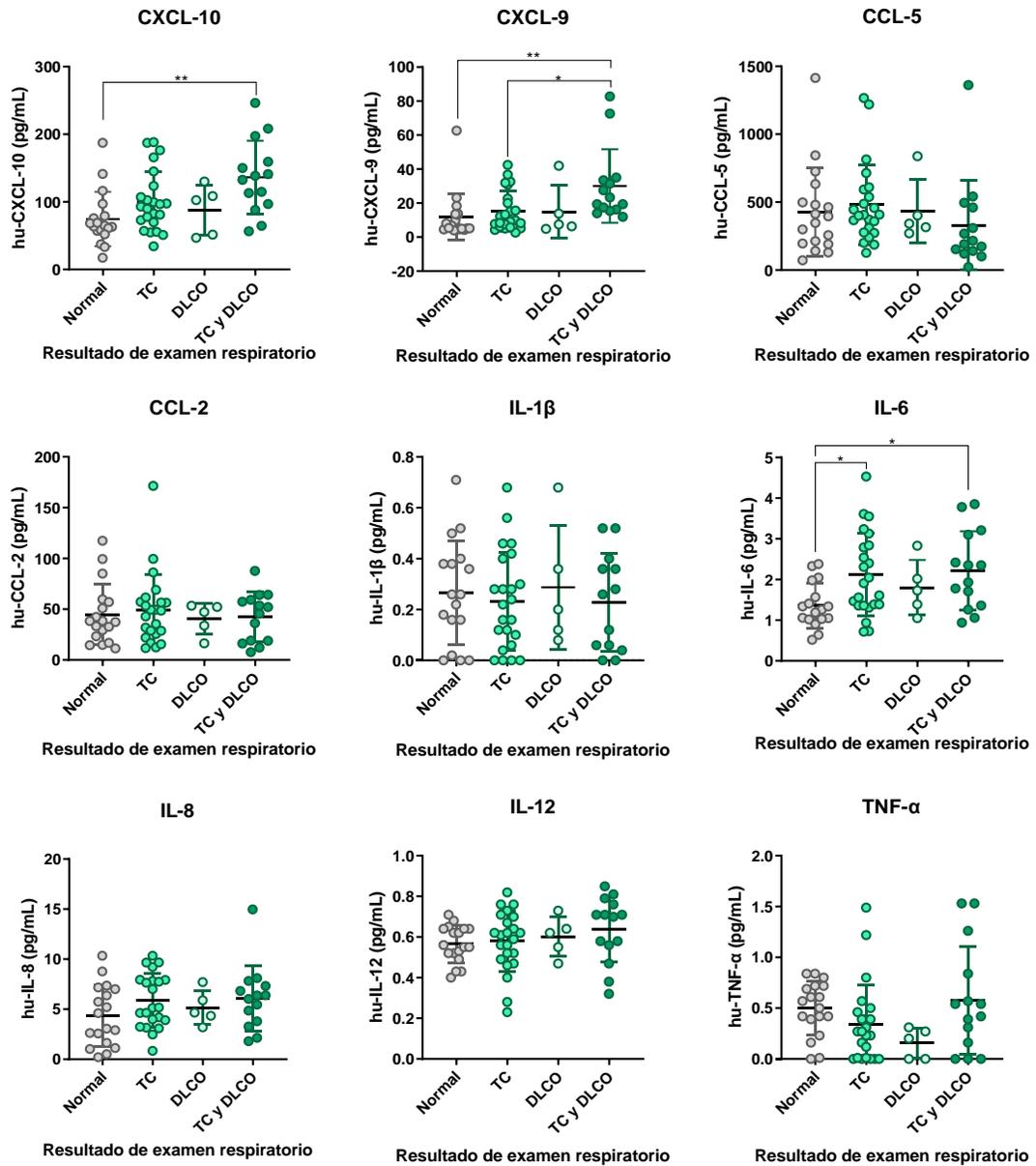


**FIGURA 30. Comparación de los niveles de citoquinas en etapa activa según la categorización de pacientes.**

Se realiza una comparación mediante T test con los datos obtenidos durante la etapa activa de la COVID-19 partir de los niveles de quimioquinas CXCL-10, CXCL-9, CCL-2 y citoquinas IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  con respecto a la categorización de pacientes secuestrados según sus resultados es los exámenes respiratorios TCT y DLCO 4 meses post COVID-19. (T test, Valor p: \*<0.05)

### **6.3.2) Secuela pulmonar y citoquinas pertenecientes al reclutamiento 1.**

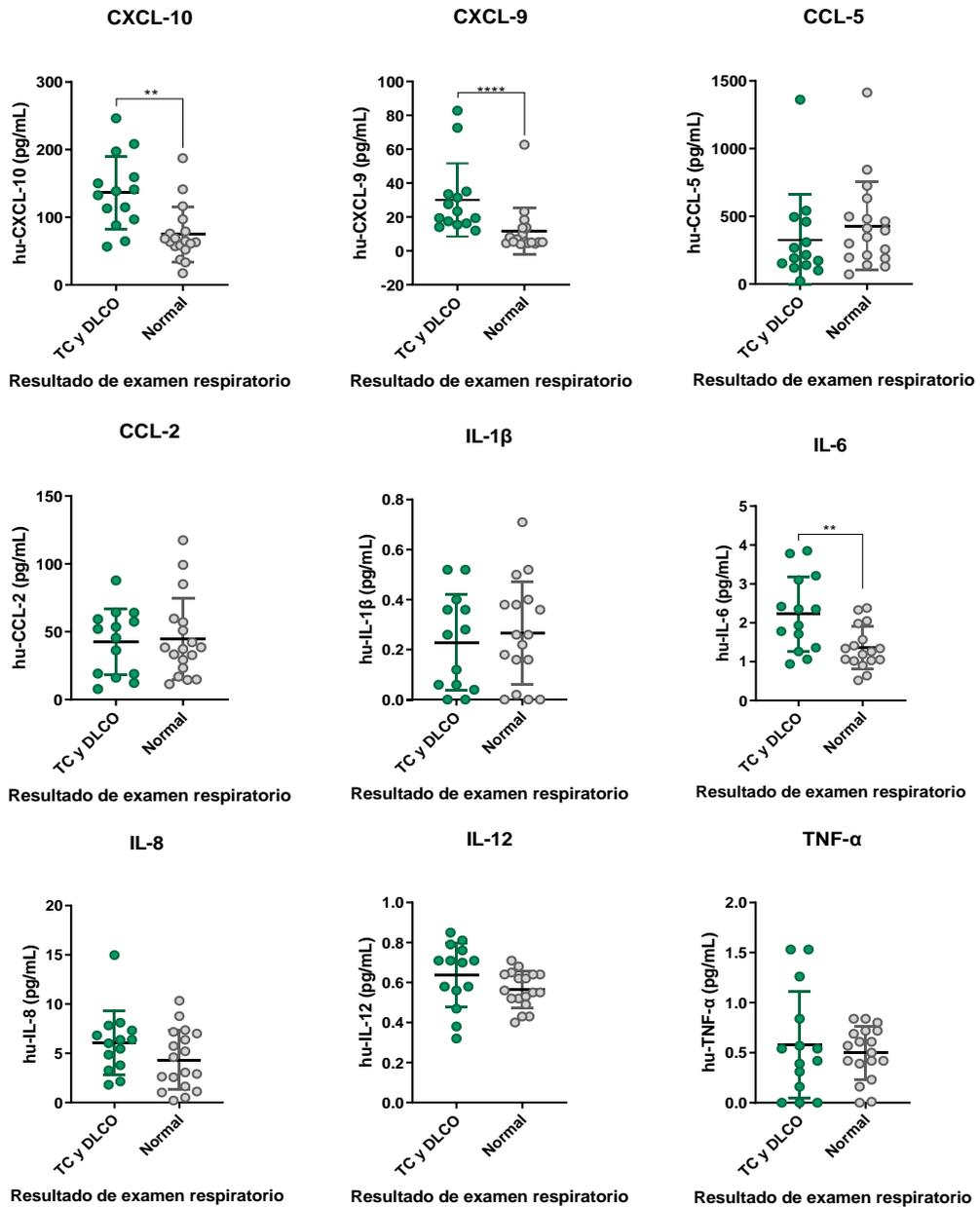
Según los datos obtenidos en el reclutamiento 1 con respecto a los exámenes respiratorios realizados y los niveles de citoquinas cuantificadas fue posible identificar un aumento significativo (**Figura 31**) de la citoquina IL-6 y de las quimioquinas CXCL-10 y CXCL-9 en el grupo de pacientes con DPLP por sobre el grupo que no presenta alteración en sus exámenes pulmonares, donde además se observa que el grupo con DPLP mantiene un aumento significativo de CXCL-9 por sobre el grupo con TC alterada por si sola. Otra diferencia que se aprecia entre los grupos corresponde a un aumento significativo de IL-6 en el grupo con TC alterada por si sola por sobre el grupo normal.



**FIGURA 31. Comparación de los niveles de citoquinas en reclutamiento 1 según la categorización de pacientes.**

Se realiza una comparación mediante test ANOVA con los datos obtenidos durante el reclutamiento 1 a partir de los niveles de quimioquinas CXCL-10, CXCL-9, CCL-2, CCL-5 y citoquinas IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  con respecto a la categorización de pacientes secuestrados según sus resultados es los exámenes respiratorios TCT y DLCO. (Test ANOVA, Valor p: \* $<0.05$ ; \*\* $<0.01$ )

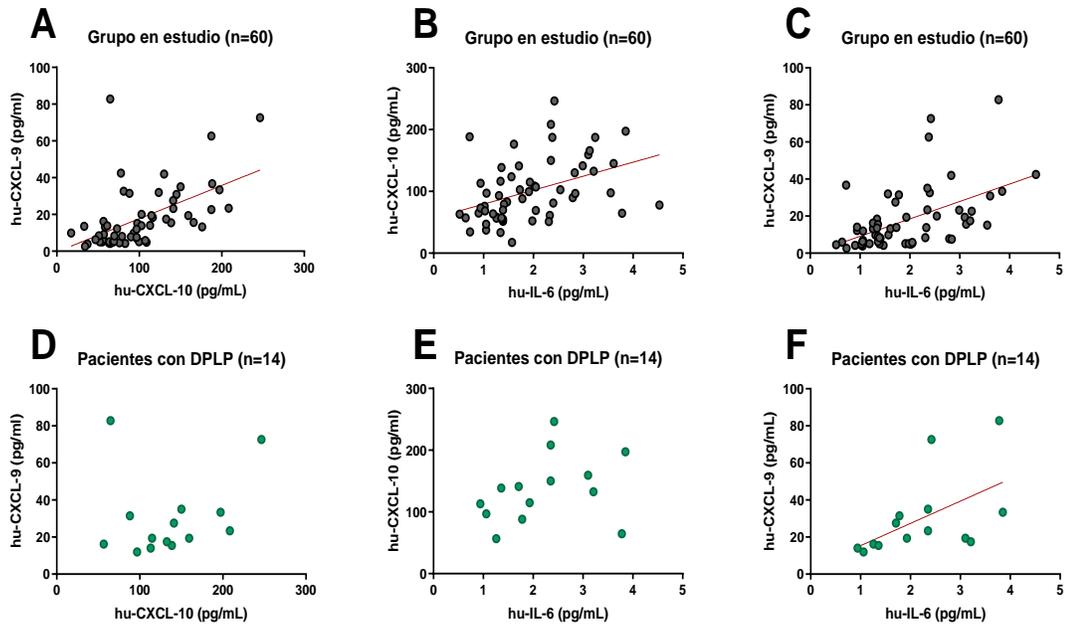
Al realizar una comparación simple según los datos obtenidos en el reclutamiento 1 entre quienes presentaron todos sus exámenes respiratorios normales y quienes fueron clasificados con DPLP (**Figura 32**), es que la citoquina IL-6 y las quimioquinas CXCL-10 y CXCL-9 se encuentran significativamente elevadas entre los pacientes con DPLP.



**FIGURA 32. Comparación de la cuantificación de citoquinas (reclutamiento 1) entre el grupo con DPLP y el grupo normal.**

Se realizó una comparación entre la cuantificación de las quimioquinas CXCL-10, CXCL-9, CCL-2, CCL-5 y las citoquinas IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  obtenidas en el reclutamiento 1 pertenecientes a los 14 pacientes clasificados con DPLP con respecto al grupo que no manifestó exámenes respiratorios alterados compuesto por 18 individuos. (Test ANOVA, Valor p: \*\*<0.01; \*\*\*\*<0,0001)

Tras determinar cuáles son las citoquinas y quimioquinas de mayor relevancia entre los pacientes, se evaluó la correlación de los datos. Primero, se tomó a todo el grupo en estudio (n=60) y fue posible determinar la existencia de una correlación total entre CXCL-10, CLXCL-9 e IL-6 (**Figura 33-A -B -C**). Luego, solo se evaluó la correlación existente de esta citoquina y quimioquinas en el grupo que manifestó DPLP, siendo posible determinar solo una correlación entre las variables CXCL-9 e IL-6 (**Figura 33-F**).

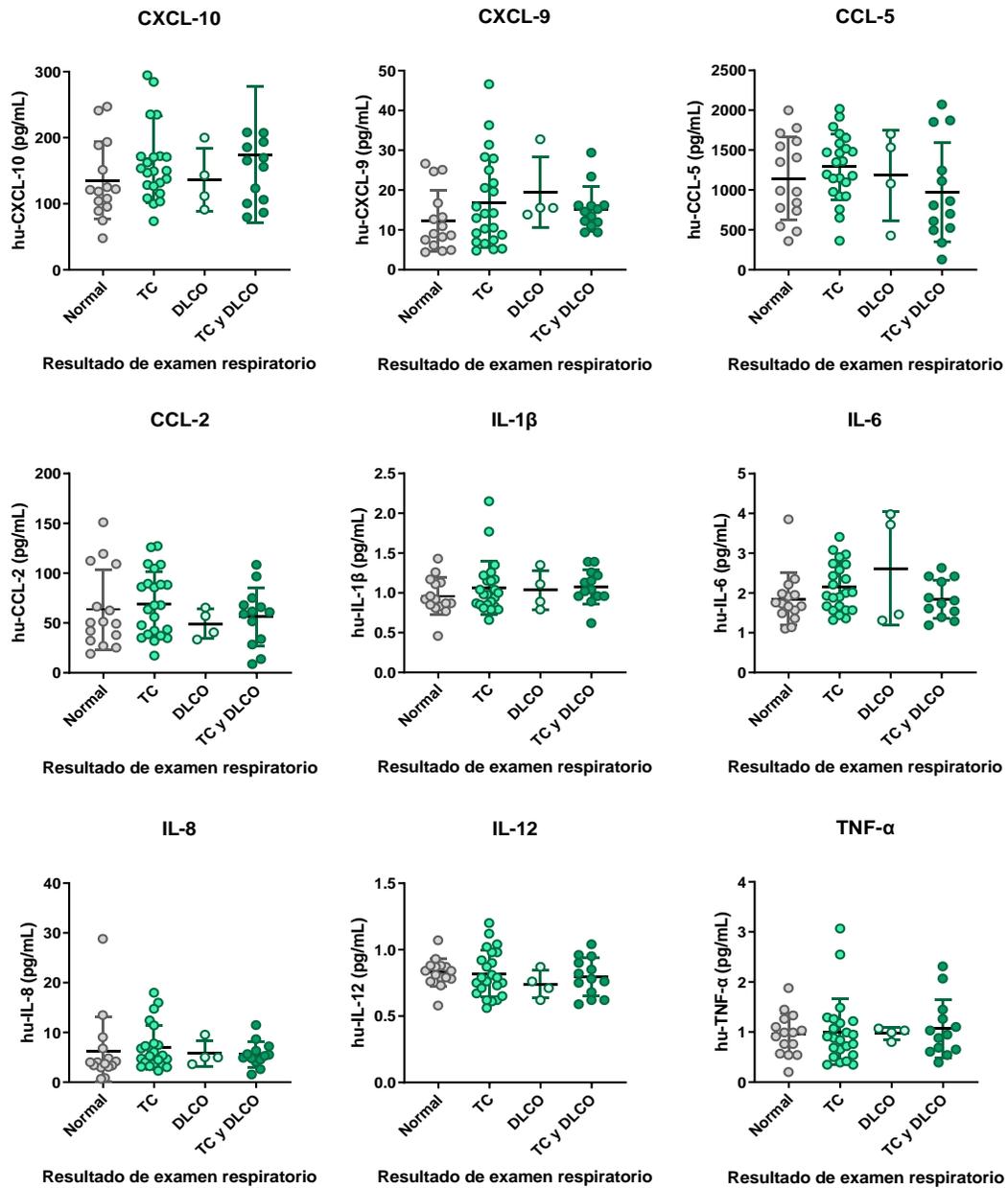


**FIGURA 33. Correlación de CXCL-10, CXCL-9 e IL-6 durante reclutamiento 1.**

Estudio mediante gráfico de correlación entre las citoquinas y quimioquinas de mayor relevancia entre los pacientes que manifestaron secuelas respiratorias post COVID-19. El análisis fue realizado en **(A, B y C)** todo el grupo en estudio y luego **(D, E y F)** solo entre los pacientes con DPLP. (Regresión lineal simple, Valor  $p$ : **(A)** \*\*\*\* $<0,0001$ ; **(B)** \*\*\* $<0,001$ ; **(C)** \*\*\*\* $<0,0001$ ; **(F)** \* $<0,05$ )

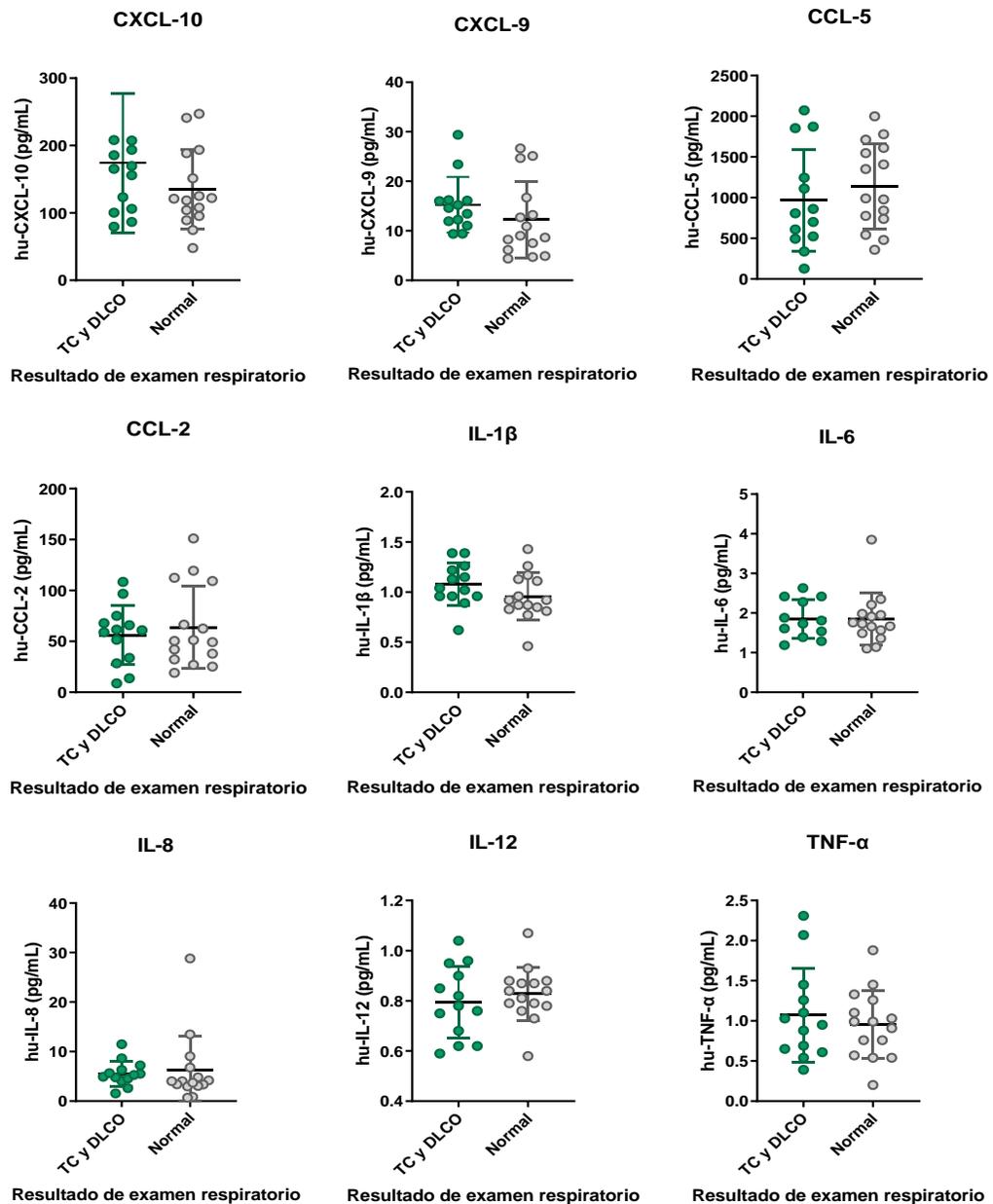
### **6.3.3) Secuela pulmonar y citoquinas pertenecientes al reclutamiento 2.**

La cuantificación realizada 12 meses post COVID-19 y su comparación entre los 4 sub grupos formados nos entregó resultados concretos puesto que no existieron diferencias significativas en ninguna citoquina o quimioquina evaluada (**Figura 34**), luego, al comparar los niveles cuantificados de proteínas inflamatorias por si solas entre el grupo normal y el grupo que presenta DPLP tampoco fue posible observar grandes diferencias cuantitativas (**Figura 35**).



**FIGURA 34. Comparación de los niveles de citoquinas en reclutamiento 2 según la categorización de pacientes.**

Se realiza una comparación mediante test ANOVA con los datos obtenidos durante el reclutamiento 2 a partir de los niveles de quimioquinas CXCL-10, CXCL-9, CCL-2, CCL-5 y citoquinas IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  con respecto a la categorización de pacientes secuestrados según sus resultados es los exámenes respiratorios TCT y DLCO. (Test ANOVA, Valor p:  $* < 0.05$ )



**FIGURA 35, Comparación de la cuantificación de citoquinas (reclutamiento 2) entre el grupo con DPLP y el grupo normal.**

Se realizó una comparación entre la cuantificación de las quimioquinas CXCL-10, CXCL-9, CCL-2, CCL-5 y las citoquinas IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  obtenidas en el reclutamiento 2 pertenecientes a los 14 pacientes clasificados con DPLP con respecto al grupo que no manifestó exámenes respiratorios alterados compuesto por 18 individuos. (Test ANOVA, Valor p: \* $<0.05$ )

#### **Objetivo específico 4**

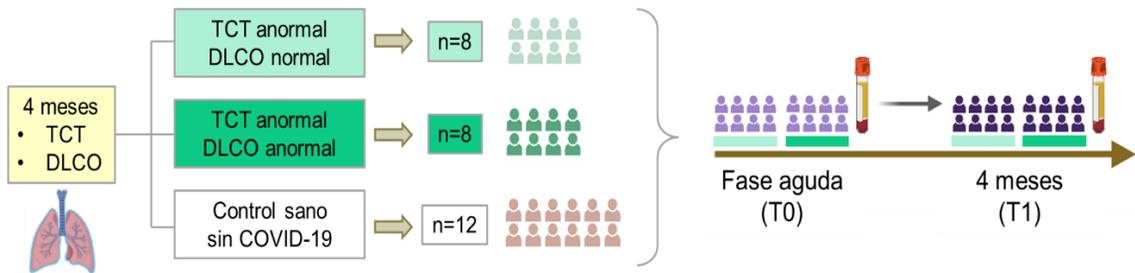
Analizar las vías canónicas diferencialmente activadas en circulación de pacientes recuperados de COVID-19 con secuelas pulmonares por medio de análisis de proteómico durante el estado agudo y 4 meses post infección.

#### **6.4) Proteómica.**

##### **6.4.1) Obtención de muestras para análisis de proteoma.**

Para alcanzar resultados que nos ayudaran a reconocer los parámetros proteicos que justifican una DPLP en un grupo de pacientes post COVID-19 fue necesario evaluar el perfil del proteoma sérico durante la etapa aguda y 4 meses post COVID-19 de un sub conjunto de pacientes que integran nuestro grupo en estudio. Para ello se consideró a 16 pacientes que desarrollaron neumonía por COVID-19 durante la fase aguda de la patología, de los cuales 8 individuos terminaron por pertenecer al grupo con DPLP, mientras que, los 8 restantes recalaron en el grupo que presentó solo su TCT alterada 4 meses post COVID-19. Incluyendo como controles en este análisis a individuos sin COVID-19, confirmados mediante PCR negativa (**Figura 36**). La selección de estos pacientes para el análisis proteómico recae en la similitud de las características de estos individuos durante la etapa aguda de la enfermedad, como lo es la severidad con la que manifestaron COVID-19, desarrollo de SARS, edad y

comorbilidades previas. Siendo estos pacientes los que, por alguna razón, proceden a separarse en dos grupos 4 meses post COVID-19 con diferentes grados de secuelas pulmonares, es por esto, que el estudio del proteoma durante el periodo agudo de la COVID-19 se enfocó en dilucidar vías que se encuentran activadas y que contribuyan a una DPLP 4 meses posterior al diagnóstico de la patología, mientras que, el análisis proteómico de las muestras obtenidas en el periodo de recuperación de 4 meses se centró en identificar vías activadas asociadas con los problemas respiratorios de los pacientes.

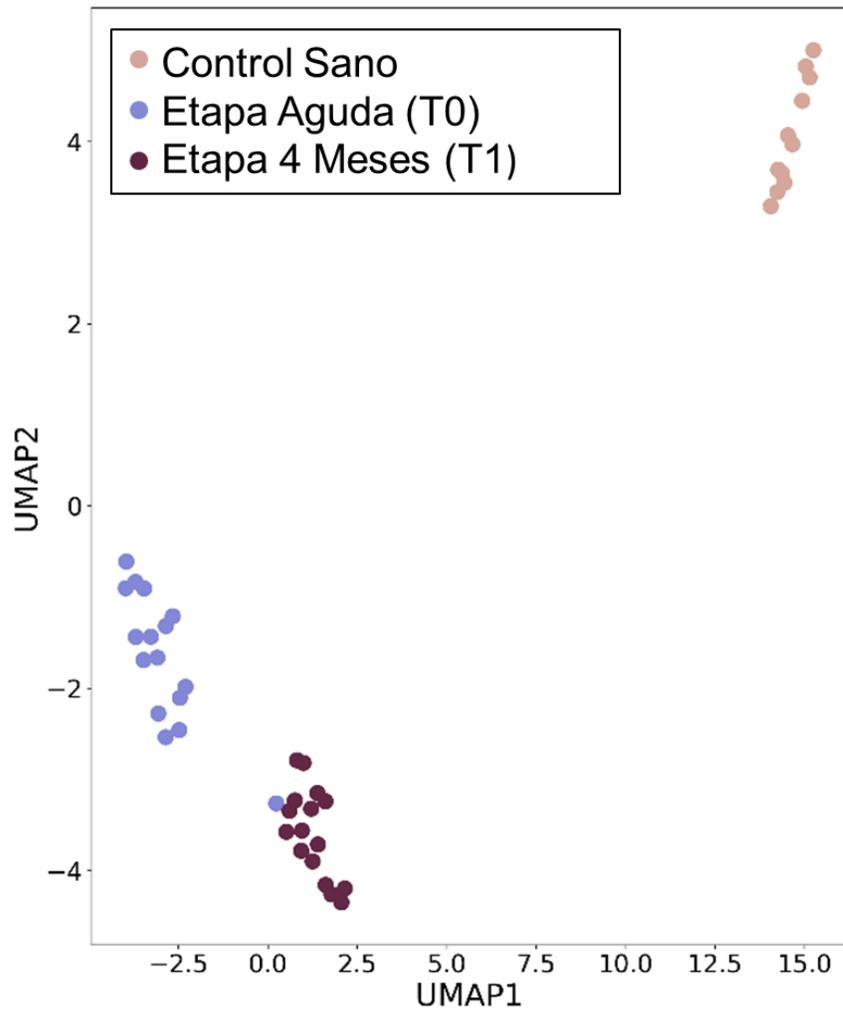


**FIGURA 36. Resumen de procedencia de muestras de suero para análisis proteómico.**

Las muestras de suero pertenecientes a 16 pacientes que componen el grupo en estudio fueron obtenidas durante la etapa aguda y 4 meses post COVID-19. Estas muestras de suero pertenecen a pacientes que manifestaron TCT alterada por si sola o TCT y DLCO alterados al mismo tiempo durante la evaluación pulmonar realizada 4 meses post COVID-19. Específicamente son 8 los individuos que manifestaron TCT alterada por si sola y 8 los que manifestaron TCT y DLCO alterados al mismo tiempo, mientras que, son 12 los controles sanos sin COVID-19 que se incluyen dentro del análisis.

#### **6.4.2) Análisis del proteoma sérico.**

Al evaluar de forma general la presencia de proteínas en suero mediante un análisis de componentes principales (PCA) fue posible determinar que las muestras provenientes de la fase aguda, fase de recuperación de 4 meses y controles sanos denotan la presencia de 3 grupos definidos (**Figura 37**).



**FIGURA 37. Análisis de componentes principales.**

PCA que determina la presencia de 3 conjuntos de proteínas diferentes pertenecientes al suero de pacientes obtenidos durante la etapa aguda, 4 meses post COVID-19 y controles sanos.

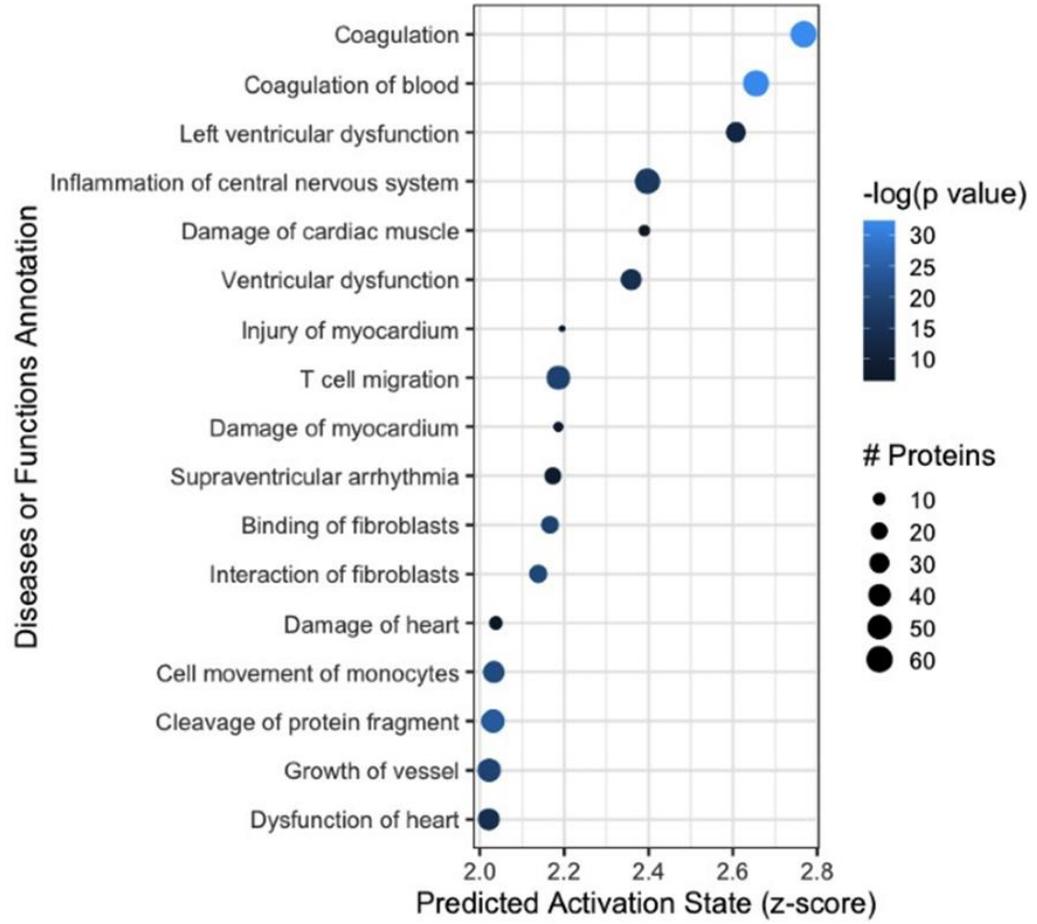
Luego, al evaluar los datos mediante un mapa de calor fue posible determinar la presencia y abundancia de varias proteínas por grupo (**Figura 38-A**), destacando durante T0 la abundancia de ciertas proteínas que no se encuentran en los controles sanos ni tampoco entre los mismos pacientes durante T1, tales como proteínas del complemento, CD-14<sup>+</sup> como marcador de células inmunes, diferentes sub unidades que componen el proteasoma y proteínas relacionadas con el trabajo hepático como son ALP y APO-E. Mientras que durante T1 también es posible encontrar abundancia de proteínas que no se observan en los controles sanos ni durante T0, como son la presencia de distintos genes relacionados con factores de crecimiento, presencia de distintos tipos de cadherinas y de marcadores celulares como CD55 y CD44, relacionados con la desaparición del complemento y la migración/adhesión celular respectivamente. Todas estas proteínas se relacionan directamente con vías relevantes que se encuentran activadas de forma diferencial entre las muestras provenientes de T0, T1 y controles sanos (**Figura 38-B**) según un análisis de vías de ingenio (IPA).

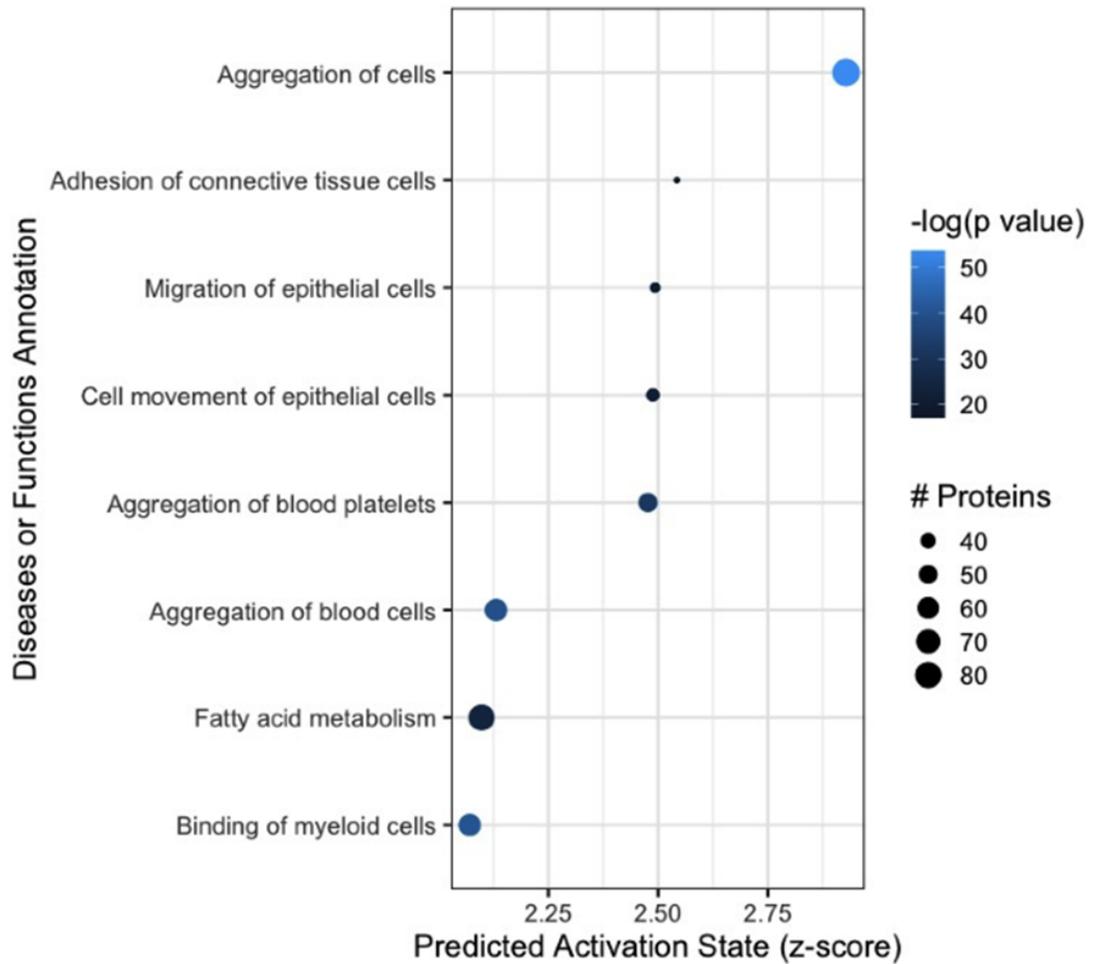


De esta manera, para realizar un estudio exhaustivo de las vías activadas identificables es que se realizó una comparación mediante análisis IPA entre los resultados obtenidos para el grupo con TCT alterada por si sola y el grupo con DPLP a partir de las muestras obtenidas de estos pacientes durante el periodo agudo de la enfermedad, en busca de determinar diferencias significativas en relación a enfermedad o contribución a una DPLP (**Figura 39-A**). De esta forma es que el análisis precisó a la coagulación como la vía activada con mayor significancia en el grupo con DPLP por sobre los pacientes del grupo con TCT alterada, seguido de vías relacionadas con disfunción o daño cardíaco, inflamación del sistema nerviosos central, unión de fibroblastos y migración de células T y monocitos.

Posteriormente, se realizó la misma comparación, pero ahora con los parámetros identificados a partir de las muestras obtenidas durante la etapa de recuperación de 4 meses (**Figura 39-B**). Así se identificó que las vías relacionadas con la agregación de células sanguíneas y plaquetas, la adhesión de células del tejido conectivo, el movimiento de células epiteliales, la unión de células mieloides y el metabolismo de ácidos grasos son vías activas con mayor significancia identificadas en los pacientes que padecen DPLP por sobre el grupo de pacientes que terminó por padecer solo su TCT alterada.

**A**



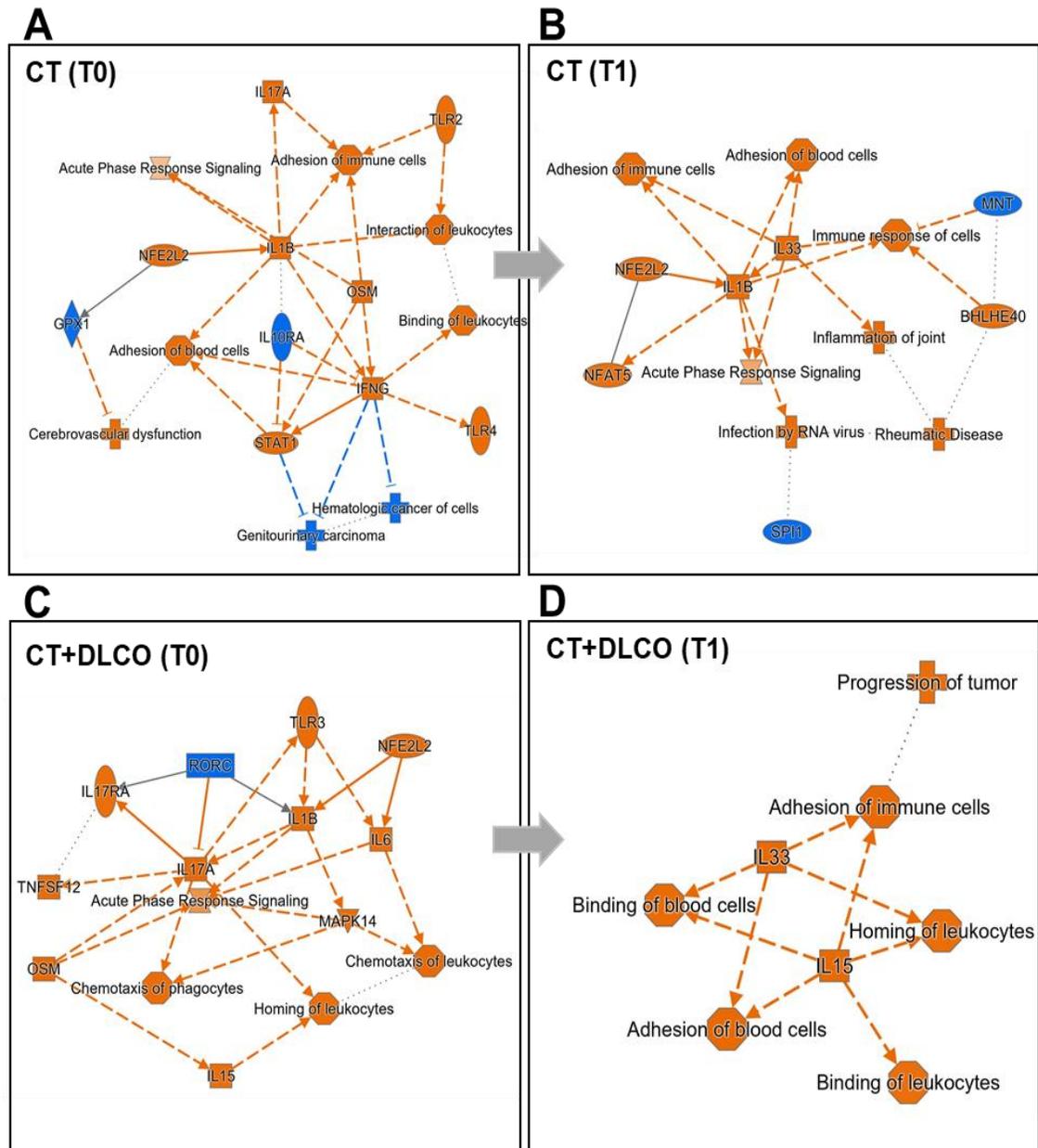
**B**

**FIGURA 39. Vías diferencialmente activas en pacientes con DPLP.**

Comparación de vías activas identificadas mediante IPA en busca de diferencias significativas entre los individuos que padecen DPLP por sobre los participantes que integran el grupo con TCT alterada por si sola a partir de las muestras obtenidas en **(A)** la etapa aguda y **(B)** 4 meses post COVID-19.

Finalmente, al observar los resultados obtenidos a partir del análisis del proteoma (**Figura complementaria 1**) en forma de resumen gráfico (**Figura 40**) desde muestras de suero pertenecientes al periodo T0 y T1 de los pacientes que presentaron solo su TCT alterada y los pacientes que manifestaron DPLP, es posible determinar que durante T0 en los pacientes que pertenecen al grupo con TCT alterada (**Figura 40-A**) se observa que la vía que se encuentra activada en forma diferencial (Vías naranjas) al grupo con DPLP es la vía relacionada a IFN- $\gamma$  y mediada en este caso por la señalización de proteínas internas como TLR-4 y STAT-1. Mientras que, en T0 entre los pacientes que terminaron por manifestar DPLP (**Figura 40-C**) las vías activadas en forma diferencial al grupo con TCT alterada son las vías relacionadas con la señalización de la respuesta de fase aguda, mediada principalmente en este caso por IL-6 y la quimiotaxis de leucocitos, sobre todo fagocitos.

Luego, al observar los resultados correspondientes a las muestras obtenidas durante T1 es posible encontrar una menor cantidad de diferencias, pero, entre los pacientes con solo TCT alterada (**Figura 40-B**), destaca la presencia de vías diferencialmente activas relacionadas con enfermedad reumática y vías diferencialmente inhibidas (Vías azules) relacionadas con la fibrosis. Por otra parte, el grupo de pacientes que terminó por desarrollar DPLP (**Figura 40-D**), manifiesta vías activadas relacionadas con la adhesión de células sanguíneas, unión y adhesión de leucocitos y progresión de tumores.

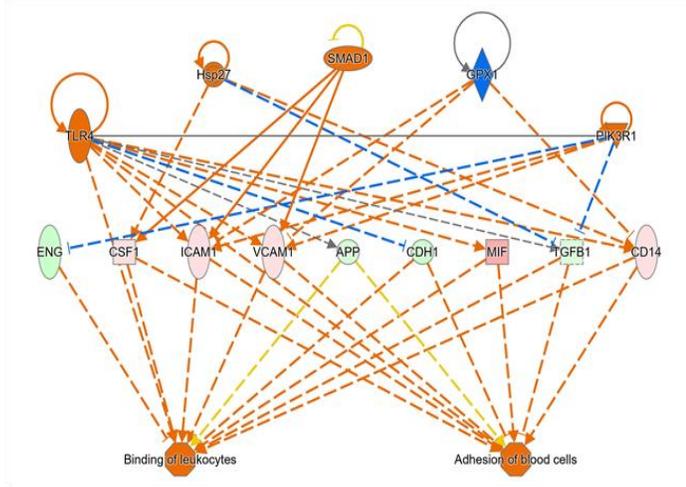


**FIGURA 40. Resumen gráfico de vías activas o inhibidas por condición.**

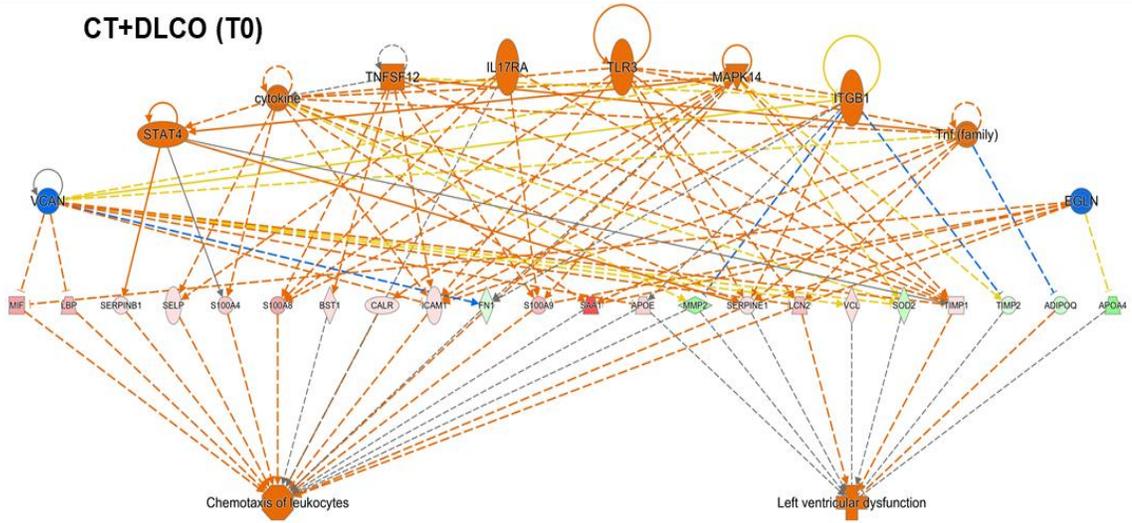
Vías diferencialmente activas (Naranja) o inhibidas (Azul) detectadas mediante análisis de proteoma sérico en muestras de pacientes que manifestaron **(A)** solo TCT alterada obtenidas durante T0 y **(B)** T1, igual como se realizó en muestras de pacientes que **(C)** desarrollaron DPLP post COVID-19 obtenidas durante T0 y **(D)** T1.

Siguiendo la línea de resúmenes gráficos a partir de los resultados del análisis proteómico, también se obtuvo un resumen de la red de mayor efecto regulatorio por condición a partir de las muestras pertenecientes a T0 (**Figura 41**). De esta forma es que según la asociación entre las proteínas encontradas es posible ligarlas con diferentes efectos perjudiciales, denotando en este sentido como las principales vías activadas dentro del grupo con TCT alterada durante T0 a la unión de leucocitos y adhesión de células rojas, mientras que el grupo que terminó por presentar un mayor número de secuelas mantenía activadas vías durante T0 ligadas a la quimiotaxis de leucocitos y a la disfunción ventricular izquierda.

### CT (T0)



### CT+DLCO (T0)



**FIGURA 41. Red de mayor efecto regulatorio por condición durante T0.**

Resumen de las principales vías activadas por condición durante T0 relacionadas con daño a partir de la asociación entre las proteínas encontradas mediante análisis de proteoma sérico.

## 7. DISCUSIÓN

El presente estudio fue realizado con la finalidad de determinar posibles mediadores de una disfunción pulmonar a largo plazo post COVID-19 a partir de 60 pacientes chilenos que padecieron la enfermedad con diferente grado de gravedad. Estos participantes fueron reclutados a los 4 y 12 meses luego de superar la COVID-19, determinando durante el reclutamiento 1 una división de los 60 participantes en 4 grupos formados según las secuelas pulmonares identificadas mediante los exámenes DLCO y TCT, definiendo de esta manera que una DPLP consta de una alteración conjunta de los test TCT y DLCO. A partir de esta clasificación de los individuos, nos enfocamos en analizar todas las variables medidas en busca de hallazgos relevantes que diferencien al grupo con DPLP de los demás.

De esta forma identificamos, en primera instancia, que según la valoración proveniente de las TCT es el grupo con DPLP el que presenta un aumento significativo del TSS por sobre el grupo que solo manifestó su TCT alterada, lo que indica que el grupo que presenta una mayor cantidad de exámenes respiratorios alterados es el que termina por manifestar una mayor extensión del pulmón afectado con focos inflamatorios o fibróticos 4 meses post COVID-19. Aun así, ambos grupos mencionados anteriormente, presentaron una gran homogeneidad en cuanto a las características de sus integrantes durante la etapa

aguda de la COVID-19. Con una severidad similar (moderada o grave) y el desarrollo de neumonía por COVID-19.

Estas similitudes se extienden también a los datos demográficos que se logró recopilar entre los participantes, donde una mayor edad y la presencia de dos comorbilidades (hipertensión e insulino resistencia) respaldaron la manifestación de una DPLP en comparación a los pacientes clasificados como normales, mas no existieron estas diferencias demográficas entre el grupo que terminó por manifestar DPLP frente a los pacientes con solo su TCT alterada.

EL grupo con DPLP fue el que presentó una mayor cantidad de problemáticas físicas evaluadas a los 4 meses post COVID-19 mediante la espirometría, TM6M y HGS. Así es como se determinó una disminución de parámetros espiratorios, pre y post broncodilatación, como FVC, FEV<sub>1</sub> y FEFmax frente al grupo normal y en algunos casos frente al grupo con solo TCT alterada, lo que denota en los pacientes con DPLP una menor capacidad mecánica pulmonar durante el reclutamiento 1. Así mismo, el grupo con DPLP, manifestó una menor cantidad de fuerza ejercida durante el HGS y logró recorrer una cantidad significativamente menor de metros en 6 minutos con una mayor cantidad de fatiga y una menor SpO<sub>2</sub> frente a los pacientes clasificados como normales o con solo su TCT alterada. Esta evaluación física fue repetida en 55 de los 60 pacientes 12 meses post COVID-19 a partir del TM6M y el HGS, estableciéndose que con el paso del tiempo el grupo con DPLP paulatinamente presentó una

mejora en su condición física con respecto a los demás participantes, logrando recorrer una cantidad similar de metros durante el test de marcha con respecto a los otros grupos, pero, aun así, mantienen una condición física restrictiva con una menor fuerza ejercida en el HGS y una menor SpO<sub>2</sub> luego del ejercicio.

Estos últimos resultados se respaldan por diferentes investigaciones donde se estudia la debilidad muscular respiratoria y de las extremidades como parte del síndrome post COVID-19. Es ahí donde se confirma que los pacientes que cursan con neumonía por COVID-19 manifiestan debilidad muscular generalizada con disfunción, fatiga pulmonar y muscular, con la necesidad de un mayor consumo de oxígeno y una menor eficiencia mecánica y ventilatoria durante el ejercicio post COVID-19 (Medrinal et al., 2021; Pleguezuelos et al., 2022). Además, se destaca en cortes histológicos la presencia de atrofia de fibras musculares, alteraciones metabólicas e infiltración de células inmunes (Soares et al., 2022). La causa de este síndrome posterior a la unidad de cuidados intensivos radica en gran medida por la reducción de masa y fuerza músculo esquelética durante la estadía hospitalaria, pero, esto tiene más bien un origen multisistémico, producido por la inactividad forzada y mal nutrición, además de la hipoxia, infiltración viral y celular, inflamación sistémica, degeneración de motoneuronas y a las comorbilidades previas, donde predomina la insulino resistencia y la hipertensión (de Andrade-Junior et al., 2021; Soares et al., 2022).

En cuanto a la evaluación pulmonar realizada durante el reclutamiento 2, no fue posible la repetición del examen TCT en los pacientes, aunque, se ha propuesto en otras investigaciones que los pacientes que manifiestan alteraciones en sus TCT hasta 4 meses post COVID-19 mejoran paulatinamente con el tiempo, donde el daño estructural provocado por la inflamación durante la etapa activa de la patología desaparece o se manifiesta como pequeñas lagunas de tejido fibrótico en las imágenes (Liang et al., 2020). Por lo que la reevaluación pulmonar ejercida en nuestra corte a los 12 meses post COVID-19 fue realizada mediante la repetición del test DLCO en 13 de los 14 pacientes que componen el grupo con DPLP. Con esto fue posible confirmar una mejora sostenida en la capacidad funcional del pulmón de los pacientes que manifestaron una mayor cantidad de problemáticas durante el periodo de recuperación. Aun así, 9 de los 13 pacientes evaluados mantuvieron un resultado alterado en el test DLCO, lo que sustenta una DPLP en este grupo de participantes.

En los integrantes de este estudio también se realizó una cuantificación de citoquinas y quimioquinas en diferentes etapas de la COVID-19. La primera comparación que se realizó fue entre las muestras pertenecientes a la etapa activa de la patología frente a las muestras de los mismos individuos, pero obtenidas 4 meses post COVID-19, a partir de ello fue posible reconocer la manifestación de la tormenta de citoquinas característica de la etapa activa de la COVID-19 entre los pacientes que padecen la enfermedad de forma moderada o grave, donde en este caso se registró con una alta presencia de CXCL-10, CXCL-

9, IL-10, IL-8 e IL-6. Estas citoquinas son destacadas puesto que cumplen un papel fundamental en el desarrollo de la tormenta de citoquinas en la COVID-19, principalmente IL-8, IL-6 e IL-10, mientras que CXCL-10 y CXCL-9 generan la quimiotaxis de células como natural killer, monocitos y células T hacia las zonas de infección. Este fenómeno inflamatorio ha sido descrito ampliamente en estudios realizados en todo el mundo, donde una de las primeras manifestaciones que se identificó entre los enfermos por COVID-19 fue la inflamación sistémica mediada por una descontrolada respuesta inmune, con una alta presencia de IL-6 como el principal mediador de esta respuesta inflamatoria (Hoffmann et al., 2020). Esta citoquina es de suma relevancia durante la respuesta de fase aguda puesto que es el principal regulador de la síntesis de proteínas inflamatorias en el hígado, generando además un aumento de proteína C reactiva, amiloide A sérico y fibrinógeno (Castell et al., 1989). IL-6 durante la COVID-19 aguda es liberada de forma descontrolada por macrófagos, generando su señalización amplificadora de la respuesta inmune inflamatoria mediante el reconocimiento de receptores tipo Toll ubicados en la superficie celular, generando la síntesis de más citoquinas inflamatorias y siendo un gran mediador para el desarrollo de fiebre, síntoma característico entre los pacientes que padecen COVID-19 grave (Filella et al., 2002).

A partir de la cuantificación realizada en las muestras obtenidas durante el reclutamiento 1 fue posible identificar que, en promedio, los 60 pacientes que componen el grupo en estudio presentaron un aumento de distintas citoquinas y quimioquinas en comparación a los controles sanos, específicamente se reconoció un aumento de CXCL10, CXCL-9, CCL-2, CCL-5 e IL-8. Con esto es posible dilucidar que los pacientes recuperados de COVID-19 mantienen en promedio niveles elevados de citoquinas y quimioquinas relacionadas con la respuesta inflamatoria hasta por lo menos 4 meses posteriores al transcurso de la patología en comparación a individuos sanos. Esta misma relación se realizó a partir de la cuantificación de citoquinas y quimioquinas obtenidas durante el reclutamiento 2, pero esta vez no fue posible identificar diferencias entre el grupo en estudio y los controles sanos, por lo que en promedio se puede confirmar que los pacientes 12 meses post COVID-19 no presentan niveles elevados de citoquinas o quimioquinas.

Continuando en esta línea de comparaciones entre las diferentes citoquinas y quimioquinas es que se decidió dividir al grupo en estudio según sus secuelas pulmonares identificadas 4 meses post COVID-19 y volver a comparar los niveles de citoquinas y quimioquinas entre los 4 grupos formados. Se comenzó comparando los niveles de las diferentes citoquinas y quimioquinas obtenidas a partir de las 16 muestras agudas, donde fue posible en este caso dividir las en dos grupos dependiendo de las futuras secuelas que los pacientes presentarían 4 meses post COVID-19, de esta manera se clasificaron a 8 pacientes dentro del

grupo que presentaría más adelante una TCT alterada por si sola y a los otros 8 individuos dentro del grupo con TCT y DLCO alterado durante el reclutamiento 1. Con ello fue posible identificar que no existieron diferencias significativas entre ambos grupos durante la etapa aguda, lo que puede justificarse por la similitud de los participantes, no solo con respecto a la edad y las comorbilidades previas, sino que también, y más influyentemente, por la similitud de la gravedad con la que desarrollaron la patología durante su etapa aguda, recordando que estas muestras provienen de participantes que cursaron COVID-19 de forma severa. Luego, al tomar a todo el grupo en estudio 4 meses post COVID-19 y dividirlo según sus problemáticas pulmonares, fue posible identificar que los niveles de la citoquina IL-6 y de las quimioquinas CXCL-10 y CXCL-9 son significativamente más altos en el grupo con DPLP en comparación al grupo normal, mientras que solo CXCL-9 presentó un aumento significativo en el grupo con DPLP en comparación al grupo con TCT alterada por si sola. En base a la similitud inicial durante el periodo agudo de la patología del grupo con TCT alterada por si sola y el grupo con DPLP es que se realizó una comparación solo entre estos dos grupos según la cuantificación de citoquinas y quimioquinas realizada durante este primer reclutamiento, confirmando que CXCL-9 se encuentra aumentada en el grupo con DPLP, pero además, se identificó que CXCL-10 también presenta un aumento significativo en el grupo con DPLP, lo que es esperable puesto que ambas quimioquinas tienen muchas similitudes, inflamatoria a partir de la localización de células T CD4<sup>+</sup> y monocitos principalmente (Kuan et al., 2010;

Tensen et al., 1999; Zang et al., 2019). Posteriormente, a partir de los resultados obtenidos en las cuantificaciones pertenecientes al reclutamiento 1, fue posible dilucidar la existencia de una correlación entre CXCL-10, CXCL-9 e IL-6 tomando a todo el grupo en estudio, lo que habla sobre que los niveles de estas proteínas se encuentran relacionadas linealmente o que varían en forma conjunta, mientras que si solo tomamos al grupo con DPLP durante este reclutamiento, se identifica que solo existe una correlación entre CXCL-9 e IL-6, lo que habla de la importancia de estas dos proteínas como un parámetro indicador en cuanto al desarrollo de un mayor número de secuelas posterior a la COVID-19. En cuanto a esta última correlación, se ha registrado en diferentes estudios que la presencia aumentada de IL-6 y/o CXCL-9 se relacionan con enfermedades cardiovasculares, provocando un estado inflamatorio y promoviendo el desarrollo de fibroblastos a nivel cardíaco (Altara et al., 2015; Lin et al., 2019; Su et al., 2021).

Por último, no fue posible encontrar diferencias estadísticas a partir de la división de pacientes según sus secuelas pulmonares y la cuantificación de citoquinas realizada en muestras obtenidas durante el reclutamiento 2, por lo que es posible afirmar que, a partir de los datos analizados, los pacientes de nuestra cohorte clasificados con DPLP recuperan valores en sus citoquinas y quimioquinas comparables con pacientes que no presentaron secuelas de la patología, pero, aun así, estos pacientes con DPLP mantienen una función restringida o alterada a nivel pulmonar hasta 12 meses post COVID-19. Con esto es posible sugerir

que el daño pulmonar generado posterior a la COVID-19 se vuelve de carácter crónico en algunos pacientes, con la aparición de tejido fibrótico y un deterioro prolongado de la función pulmonar que impide una recuperación completa.

Finalmente, mediante el análisis del proteoma sérico de las muestras obtenidas durante la etapa aguda y 4 meses post COVID-19 procedentes de 16 pacientes que integran el grupo con TCT alterada (n=8) y el grupo con DPLP (n=8), fue posible determinar diferentes parámetros proteómicos que se asocian no solo a un mayor daño pulmonar, sino que también una mayor cantidad de secuelas de diferentes tipos posterior al desarrollo de la COVID-19. Lo primero que se visualizó claramente a partir del PCA realizado fue la diferencia entre las proteínas presentes en las muestras provenientes de la etapa aguda, etapa de recuperación de 4 meses y controles sanos del estudio, lo que habla sobre el movimiento y adaptación de la comunicación celular y del organismo humano frente a esta infección viral, no solo a nivel inmunológico, sino que, a nivel sistémico.

Luego, gracias al mapa de calor realizado para identificar concretamente las proteínas presentes durante T0 y T1 fue posible revelar la presencia durante T0 de moléculas relacionadas con una respuesta sistémica frente a la infección viral, como lo es la activación del complemento y activación de células inmunes fagocíticas, mientras que en T1 predominaban las proteínas de carácter regenerativo clásicas de una etapa de recuperación, como lo son factores de

crecimiento, cadherinas, desaparición del complemento y migración celular. A partir de la identificación y abundancia de estas proteínas es que fue posible su asociación con vías de señalización que se encuentran diferencialmente activas en el grupo con DPLP durante T0 y T1 y que se relacionan con un mayor grado de secuelas post COVID-19, estas vías de señalización activas durante T0 se ligan en gran medida a injurias de carácter endotelial centradas en la unión de fibroblastos y en el daño a nivel cardíaco, de igual forma, durante T1, fue posible visualizar la agregación de células sanguíneas y plaquetas.

Todo esto guarda una gran relación con lo identificado a partir del conteo celular realizado en los participantes durante T1, donde el conteo plaquetario es significativamente mayor en el grupo con DPLP en comparación al grupo con solo TCT alterada, dando cuenta que aún se mantiene un estado de carácter inflamatorio en los pacientes con DPLP al menos 4 meses post COVID-19. Mientras que, los niveles de CHCM son significativamente menores en el grupo con DPLP en comparación al grupo catalogado como normal, acompañado de una leve disminución en la concentración de hemoglobina en el grupo con DPLP, la cual no alcanza valores significativos. Es por esto que los niveles bajos de CHCM podrían dar cuenta de una problemática relacionada con el tamaño y la forma de los glóbulos rojos en este grupo de pacientes, disminuyendo la presencia media de hemoglobina por eritrocito sin afectar la producción y concentración de hemoglobina.

Esto nos lleva a que la respuesta inflamatoria generada por la infección viral durante la etapa aguda no solo provoca secuelas visibles o identificables fácilmente como lo son las secuelas respiratorias, donde los pacientes a simple vista pueden denotar un deterioro en su capacidad aeróbica hasta 12 meses post COVID-19, sino que también se traduce de forma importante y silenciosa en una problemática de carácter cardíaco. Esto último, además, guarda una gran relación con las citoquinas y quimioquinas que se encuentran aumentadas en el grupo con DPLP en los diferentes periodos de tiempo. CXCL-9 es la quimioquina que representó una gran importancia para diferenciar no solo al grupo con DPLP de los pacientes catalogados como normales, sino que también, como un patrón diferenciador de este grupo más afectado respiratoriamente del grupo con solo su TCT alterada, recordando que estos últimos presentaban una gran similitud durante T0. De esta forma se ha descrito en otras investigaciones que CXCL-9, la cual guarda una estrecha relación con los demás ligandos de CXCR-3, como son CXCL-11 y CXCL-10, son identificados como biomarcadores validos de la insuficiencia cardíaca y de la disfunción ventricular izquierda, promoviendo una remodelación del tejido cardíaco e induciendo la injuria (Altara et al., 2015; Altara et al., 2016). Es así, como esta problemática a nivel cardiaco puede verse relacionada con las dificultades musculares que padecen los enfermos por COVID-19, dada la menor perfusión de oxígeno que conllevaría a una recuperación más lenta de los tejidos, mayor debilidad muscular y presencia de fatiga.

Todas estas aristas lograron ser evaluadas en conjunto mediante el resumen gráfico de las proteínas y vías de señalización activas más relevantes por cada condición. Donde fue posible identificar como gran diferencia entre el grupo con TCT alterada y el grupo con DPLP la presencia de IFN- $\gamma$  y la adhesión de células inmunes durante T0 en el grupo que posteriormente durante T1 presentaría solo su TCT alterada, factor que no se encontró presente durante T0 en el grupo con DPLP, destacando en este último grupo durante T0 la respuesta de fase aguda como punto angular, con la presencia diferencial de IL-6, en conjunto con la quimiotaxis de leucocitos y fagocitos. A partir de estos resultados es posible reconocer que en base al proteoma de los pacientes existe una respuesta inflamatoria agresiva y descontrolada durante T0 en el grupo que luego terminó por manifestar un mayor número de secuelas pulmonares, con un movimiento importante de células inmunes y liberación de citoquinas y quimioquinas, a diferencia del grupo menos afectado, el cual durante T0 presentó una mayor unión de células inmunes, lo que habla sobre el reconocimiento antigénico y un posible mejor control en cuanto a la eliminación viral (Bierer & Burakoff, 1988; Roseblatt & Bono, 2004). Además, este último grupo que manifestó un menor número de problemáticas respiratorias post-COVID-19 presenta como punto angular la expresión diferencial de IFN- $\gamma$ , el cual cumple un papel crucial en la activación de macrófagos en búsqueda de una mayor capacidad fagocítica y correcta liberación de quimioquinas. Asimismo, en este estudio fue posible identificar que IFN- $\gamma$  se encuentra relacionado con la señalización de proteínas

internas como TLR-4 y STAT-1, lo que lo liga a una participación activa en la inhibición de la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> hacia células tipo Th<sub>2</sub>, promoviendo su diferenciación hacia Th<sub>1</sub> (Boehm et al., 1997; Schoenborn & Wilson, 2007), siendo estas últimas las encargadas de mediar una correcta respuesta inflamatoria por parte de las células del organismo humano, por lo que proponemos que IFN- $\gamma$  estaría cumpliendo un rol protector en este grupo de pacientes, otorgándoles una respuesta funcional y efectiva frente al virus del SARS-CoV-2 lo que conllevaría a presentar un menor número de secuelas respiratorias post COVID-19, a diferencia de lo que ocurre con el grupo que manifiesta DPLP, donde predominaría la existencia de células Th<sub>2</sub>, evitando el correcto control viral al promover una respuesta adaptativa temprana, disfuncional y que promovería el descontrol de la respuesta inmune innata, generando un mayor número de secuelas tras superar la patología.

Todo lo mencionado con respecto a la activación de vías relacionadas con el daño cardíaco y a una respuesta inflamatoria descontrolada en el grupo con DPLP se respalda por los resultados de la red de mayor efecto regulatorio por condición durante T0, donde la asociación de las proteínas encontradas en las muestras de suero se relacionan con vías de señalización implicadas en la promoción de daño post COVID-19, en base a esto se encontró que durante T0 el grupo clasificado con TCT alterada por si sola presenta proteínas que se corresponden con la unión de leucocitos y adhesión de células rojas, mientras que el grupo con DPLP, presenta vías activas asociadas a la quimiotaxis de

leucocitos y a la disfunción ventricular izquierda, por lo que se sugiere que este tipo de mecanismos activados durante la etapa aguda de la patología en el grupo con DPLP actúan de forma sinérgica para el desarrollo de un mayor número de secuelas de carácter respiratorio 4 y 12 meses post COVID-19.

## 8. CONCLUSIÓN

A partir de nuestros resultados logramos identificar que CXCL-9 aumentó de forma diferencial y significativa en el grupo con DPLP en comparación a los demás participantes. Sumando a esto que, las principales vías de señalización identificadas por proteoma en los pacientes con DPLP se asociaron con un estado inmunotrombótico ligado con disfunción cardíaca, migración de monocitos desregulados y señalización reducida de IFN- $\gamma$ . Por último, este grupo de pacientes con DPLP manifestaron una condición pulmonar restrictiva, con mayor fatiga, menor capacidad aeróbica y fuerza muscular 4 meses post-COVID-19, además de mantener una disfuncionalidad pulmonar hasta 12 meses posteriores al transcurso de la enfermedad, a partir de esto, se sugiere que la DPLP pudo ser inducida por la disfunción cardíaca y la desregulada respuesta inmunológica que presentaron los pacientes más graves durante T0 de la COVID-19.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwala, P., & Salzman, S. H. (2020). Six-Minute Walk Test: Clinical Role, Technique, Coding, and Reimbursement. *Chest*, 157(3), 603-611. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.10.014>
- Altara, R., Gu, Y. M., Struijker-Boudier, H. A., Thijs, L., Staessen, J. A., & Blankesteyn, W. M. (2015). Left Ventricular Dysfunction and CXCR3 Ligands in Hypertension: From Animal Experiments to a Population-Based Pilot Study. *PLoS One*, 10(10), e0141394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141394>
- Altara, R., Manca, M., Hessel, M. H., Gu, Y., van Vark, L. C., Akkerhuis, K. M., Staessen, J. A., Struijker-Boudier, H. A., Booz, G. W., & Blankesteyn, W. M. (2016). CXCL10 Is a Circulating Inflammatory Marker in Patients with Advanced Heart Failure: a Pilot Study. *J Cardiovasc Transl Res*, 9(4), 302-314. <https://doi.org/10.1007/s12265-016-9703-3>
- Bai, Y., Yao, L., Wei, T., Tian, F., Jin, D. Y., Chen, L., & Wang, M. (2020). Presumed Asymptomatic Carrier Transmission of COVID-19. *Jama*, 323(14), 1406-1407. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2565>
- Bazdyrev, E., Rusina, P., Panova, M., Novikov, F., Grishagin, I., & Nebolsin, V. (2021). Lung Fibrosis after COVID-19: Treatment Prospects. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/ph14080807>
- Benítez-Pérez, R. E., Torre-Bouscoulet, L., Villca-Alá, N., Del-Río-Hidalgo, Rodrigo Francisco, Pérez-Padilla, R., Vázquez-García, J. C., Silva-Cerón, M., Cid-Juárez, S., & Gochicoa-Rangel, L. (2016). Espirometría: recomendaciones y procedimiento. *Neumología y cirugía de tórax*, 75, 173-190. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0028-37462016000200173&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462016000200173&nrm=iso)
- Bierer, B. E., & Burakoff, S. J. (1988). T cell adhesion molecules. *Faseb j*, 2(10), 2584-2590. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2.10.2838364>
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15, 749-795. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.749>
- Cáceres-Bernaola, U., Becerra-Núñez, C., Mendivil-Tuchía de Tai, S., Ravelo-Hernández, J., & Quispe-Ayuque, E. (2020). Valoración tomográfica inicial en pacientes con neumonía por COVID-19 en el Hospital Central de la Fuerza Aérea del Perú: serie de casos. *Acta Médica Peruana*, 37, 330-335. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1728-59172020000300330&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172020000300330&nrm=iso)
- Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., David, M., Andus, T., Geiger, T., Trullenque, R., Fabra, R., & Heinrich, P. C. (1989). Interleukin-6 is the major regulator

- of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett*, 242(2), 237-239. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80476-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80476-4)
- CAVIEDES S, I., BORZONE T, G., BRICEÑO V, C., MERCADO M, G., SCHÖNFFELDT G, P., & CÉSPEDES G, J. (2014). Estandarización de la prueba de capacidad de difusión de monóxido de carbono: Chilean Society of Respiratory Diseases guidelines. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 30, 145-155. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-73482014000300004&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-73482014000300004&nrm=iso)
- Chen, J., Wu, L., Zhang, J., Zhang, L., Gong, D., Zhao, Y., Chen, Q., Huang, S., Yang, M., Yang, X., Hu, S., Wang, Y., Hu, X., Zheng, B., Zhang, K., Wu, H., Dong, Z., Xu, Y., Zhu, Y., . . . Yu, H. (2020). Deep learning-based model for detecting 2019 novel coronavirus pneumonia on high-resolution computed tomography. *Sci Rep*, 10(1), 19196. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76282-0>
- Chung, M., Bernheim, A., Mei, X., Zhang, N., Huang, M., Zeng, X., Cui, J., Xu, W., Yang, Y., Fayad, Z. A., Jacobi, A., Li, K., Li, S., & Shan, H. (2020). CT Imaging Features of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV). *Radiology*, 295(1), 202-207. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200230>
- Corman, V. M., Muth, D., Niemeyer, D., & Drosten, C. (2018). Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv Virus Res*, 100, 163-188. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.01.001>
- Cronin, J., Lawton, T., Harris, N., Kilding, A., & McMaster, D. T. (2017). A Brief Review of Handgrip Strength and Sport Performance. *J Strength Cond Res*, 31(11), 3187-3217. <https://doi.org/10.1519/jsc.0000000000002149>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 17(3), 181-192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Dayarathna, S., Jeewandara, C., Gomes, L., Somathilaka, G., Jayathilaka, D., Vimalachandran, V., Wijewickrama, A., Narangoda, E., Idampitiya, D., Ogg, G. S., & Malavige, G. N. (2020). Similarities and differences between the 'cytokine storms' in acute dengue and COVID-19. *Sci Rep*, 10(1), 19839. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76836-2>
- de Andrade-Junior, M. C., de Salles, I. C. D., de Brito, C. M. M., Pastore-Junior, L., Righetti, R. F., & Yamaguti, W. P. (2021). Skeletal Muscle Wasting and Function Impairment in Intensive Care Patients With Severe COVID-19. *Front Physiol*, 12, 640973. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.640973>
- Dolan, M. E., Hill, D. P., Mukherjee, G., McAndrews, M. S., Chesler, E. J., & Blake, J. A. (2020). Investigation of COVID-19 comorbidities reveals genes and pathways coincident with the SARS-CoV-2 viral disease. *Scientific Reports*, 10(1), 20848. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77632-8>
- Feng, Z., Diao, B., Wang, R., Wang, G., Wang, C., Tan, Y., Liu, L., Wang, C., Liu, Y., Liu, Y., Yuan, Z., Ren, L., Wu, Y., & Chen, Y. (2020). The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly

- Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. *medRxiv*, 2020.2003.2027.20045427. <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.20045427>
- Fernández-de-Las-Peñas, C., Palacios-Ceña, D., Gómez-Mayordomo, V., Florencio, L. L., Cuadrado, M. L., Plaza-Manzano, G., & Navarro-Santana, M. (2021). Prevalence of post-COVID-19 symptoms in hospitalized and non-hospitalized COVID-19 survivors: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Intern Med*, 92, 55-70. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2021.06.009>
- Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. (2002). Estructura y función de las citocinas. *Medicina Integral*, 39(2), 63-71. <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-estructura-funcion-citocinas-13026682>
- Francone, M., Iafrate, F., Masci, G. M., Coco, S., Cilia, F., Manganaro, L., Panebianco, V., Andreoli, C., Colaiacomo, M. C., Zingaropoli, M. A., Ciardi, M. R., Mastroianni, C. M., Pugliese, F., Alessandri, F., Turriziani, O., Ricci, P., & Catalano, C. (2020). Chest CT score in COVID-19 patients: correlation with disease severity and short-term prognosis. *Eur Radiol*, 30(12), 6808-6817. <https://doi.org/10.1007/s00330-020-07033-y>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847-2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Guler, S. A., Ebner, L., Aubry-Beigelman, C., Bridevaux, P. O., Brutsche, M., Clarenbach, C., Garzoni, C., Geiser, T. K., Lenoir, A., Mancinetti, M., Naccini, B., Ott, S. R., Piquilloud, L., Prella, M., Que, Y. A., Soccac, P. M., von Garnier, C., & Funke-Chambour, M. (2021). Pulmonary function and radiological features 4 months after COVID-19: first results from the national prospective observational Swiss COVID-19 lung study. *Eur Respir J*, 57(4). <https://doi.org/10.1183/13993003.03690-2020>
- Hasichaolu, Zhang, X., Li, X., Li, X., & Li, D. (2020). Circulating Cytokines and Lymphocyte Subsets in Patients Who Have Recovered from COVID-19. *Biomed Res Int*, 2020, 7570981. <https://doi.org/10.1155/2020/7570981>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271-280.e278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hong, K. S., Ahn, J. H., Jang, J. G., Lee, J. H., Kim, H. N., Kim, D., & Lee, W. (2020). GSK-LSD1, an LSD1 inhibitor, quashes SARS-CoV-2-triggered cytokine release syndrome in-vitro. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 267. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00391-5>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 141-154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

- Huang, Y., Tan, C., Wu, J., Chen, M., Wang, Z., Luo, L., Zhou, X., Liu, X., Huang, X., Yuan, S., Chen, C., Gao, F., Huang, J., Shan, H., & Liu, J. (2020). Impact of coronavirus disease 2019 on pulmonary function in early convalescence phase. *Respir Res*, 21(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01429-6>
- Jain, A., Chaurasia, R., Sengar, N. S., Singh, M., Mahor, S., & Narain, S. (2020). Analysis of vitamin D level among asymptomatic and critically ill COVID-19 patients and its correlation with inflammatory markers. *Scientific Reports*, 10(1), 20191. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77093-z>
- Kuan, W. P., Tam, L. S., Wong, C. K., Ko, F. W., Li, T., Zhu, T., & Li, E. K. (2010). CXCL 9 and CXCL 10 as Sensitive markers of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 37(2), 257-264. <https://doi.org/10.3899/jrheum.090769>
- Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol*, 5(4), 562-569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
- Li, K., Wu, J., Wu, F., Guo, D., Chen, L., Fang, Z., & Li, C. (2020). The Clinical and Chest CT Features Associated With Severe and Critical COVID-19 Pneumonia. *Invest Radiol*, 55(6), 327-331. <https://doi.org/10.1097/rli.0000000000000672>
- Liang, B., Xie, L., Yang, F., Makamure, J., Zhang, L., Pang, R., Du, P., Fan, W., & Zheng, C. (2020). CT changes of severe coronavirus disease 2019 based on prognosis. *Sci Rep*, 10(1), 21849. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78965-0>
- Lin, C. F., Su, C. J., Liu, J. H., Chen, S. T., Huang, H. L., & Pan, S. L. (2019). Potential Effects of CXCL9 and CCL20 on Cardiac Fibrosis in Patients with Myocardial Infarction and Isoproterenol-Treated Rats. *J Clin Med*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/jcm8050659>
- Liu, Q. Q., Cheng, A., Wang, Y., Li, H., Hu, L., Zhao, X., Wang, T., & He, F. (2020). Cytokines and their relationship with the severity and prognosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a retrospective cohort study. *BMJ Open*, 10(11), e041471. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-041471>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., . . . Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 395(10224), 565-574. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30251-8)
- Medrinal, C., Prieur, G., Bonnevie, T., Gravier, F. E., Mayard, D., Desmalles, E., Smondack, P., Lamia, B., Combret, Y., & Fossat, G. (2021). Muscle weakness, functional capacities and recovery for COVID-19 ICU survivors. *BMC Anesthesiol*, 21(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12871-021-01274-0>

- Merad, M., & Martin, J. C. (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*, 20(6), 355-362. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>
- Pan, A., Liu, L., Wang, C., Guo, H., Hao, X., Wang, Q., Huang, J., He, N., Yu, H., Lin, X., Wei, S., & Wu, T. (2020). Association of Public Health Interventions With the Epidemiology of the COVID-19 Outbreak in Wuhan, China. *Jama*, 323(19), 1915-1923. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6130>
- Pleguezuelos, E., Del Carmen, A., Moreno, E., Ortega, P., Robles, A., Serra-Prat, M., Miravittles, M., Yebenes, J. C., & Garnacho-Castaño, M. V. (2022). Impaired pulmonary and muscle function during moderate exercise in female patients recovered from SARS-CoV-2. *Sci Rep*, 12(1), 20943. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24941-9>
- Qin, W., Chen, S., Zhang, Y., Dong, F., Zhang, Z., Hu, B., Zhu, Z., Li, F., Wang, X., Wang, Y., Zhen, K., Wang, J., Wan, Y., Li, H., Elalamy, I., Li, C., Zhai, Z., & Wang, C. (2021). Diffusion capacity abnormalities for carbon monoxide in patients with COVID-19 at 3-month follow-up. *Eur Respir J*, 58(1). <https://doi.org/10.1183/13993003.03677-2020>
- Ramírez Giraldo, J. C., Arboleda Clavijo, C., & McCollough, C. H. (2008). TOMOGRAFÍA COMPUTARIZADA POR RAYOS X: FUNDAMENTOS Y ACTUALIDAD. *Revista Ingeniería Biomédica*, 2, 54-66. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1909-97622008000200008&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-97622008000200008&nrm=iso)
- Roseblatt, M., & Bono, M. R. (2004). Functional consequences of immune cell adhesion to endothelial cells. *Curr Pharm Des*, 10(2), 109-120. <https://doi.org/10.2174/1381612043453487>
- Salama, C., Han, J., Yau, L., Reiss, W. G., Kramer, B., Neidhart, J. D., Criner, G. J., Kaplan-Lewis, E., Baden, R., Pandit, L., Cameron, M. L., Garcia-Diaz, J., Chávez, V., Mekebeb-Reuter, M., Lima de Menezes, F., Shah, R., González-Lara, M. F., Assman, B., Freedman, J., & Mohan, S. V. (2021). Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N Engl J Med*, 384(1), 20-30. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2030340>
- Sánchez-Oro, R., Torres Nuez, J., & Martínez-Sanz, G. (2020). Radiological findings for diagnosis of SARS-CoV-2 pneumonia (COVID-19). *Med Clin (Engl Ed)*, 155(1), 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2020.03.004>
- Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, 96, 41-101. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(07\)96002-2](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(07)96002-2)
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(21), 11727-11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 3, Article3. <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027>

- Soares, M. N., Eggelbusch, M., Naddaf, E., Gerrits, K. H. L., van der Schaaf, M., van den Borst, B., Wiersinga, W. J., van Vugt, M., Weijs, P. J. M., Murray, A. J., & Wüst, R. C. I. (2022). Skeletal muscle alterations in patients with acute Covid-19 and post-acute sequelae of Covid-19. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 13(1), 11-22. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12896>
- Song, C. Y., Xu, J., He, J. Q., & Lu, Y. Q. (2020). Immune dysfunction following COVID-19, especially in severe patients. *Sci Rep*, 10(1), 15838. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72718-9>
- Stekhoven, D. J., & Bühlmann, P. (2012). MissForest--non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics*, 28(1), 112-118. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr597>
- Su, J. H., Luo, M. Y., Liang, N., Gong, S. X., Chen, W., Huang, W. Q., Tian, Y., & Wang, A. P. (2021). Interleukin-6: A Novel Target for Cardio-Cerebrovascular Diseases. *Front Pharmacol*, 12, 745061. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.745061>
- Tensen, C. P., Flier, J., van der Raaij-Helmer, E. M. H., Sampat-Sardjoepersad, S., van der Schors, R. C., Leurs, R., Scheper, R. J., Boorsma, D. M., & Willemze, R. (1999). Human IP-9: A Keratinocyte-Derived High Affinity CXC-Chemokine Ligand for the IP-10/Mig Receptor (CXCR3)<sup>1</sup>. *Journal of Investigative Dermatology*, 112(5), 716-722. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00581.x>
- Tian, W., Zhang, N., Jin, R., Feng, Y., Wang, S., Gao, S., Gao, R., Wu, G., Tian, D., Tan, W., Chen, Y., Gao, G. F., & Wong, C. C. L. (2020). Immune suppression in the early stage of COVID-19 disease. *Nat Commun*, 11(1), 5859. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19706-9>
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e286. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, P., Luo, R., Zhang, M., Wang, Y., Song, T., Tao, T., Li, Z., Jin, L., Zheng, H., Chen, W., Zhao, M., Zheng, Y., & Qin, J. (2020). A cross-talk between epithelium and endothelium mediates human alveolar-capillary injury during SARS-CoV-2 infection. *Cell Death Dis*, 11(12), 1042. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03252-9>
- Wilk, A. J., Rustagi, A., Zhao, N. Q., Roque, J., Martínez-Colón, G. J., McKechnie, J. L., Ivison, G. T., Ranganath, T., Vergara, R., Hollis, T., Simpson, L. J., Grant, P., Subramanian, A., Rogers, A. J., & Blish, C. A. (2020). A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med*, 26(7), 1070-1076. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0944-y>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new

- coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). 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*, 323(13), 1239-1242. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Xu, X., Han, M., Li, T., Sun, W., Wang, D., Fu, B., Zhou, Y., Zheng, X., Yang, Y., Li, X., Zhang, X., Pan, A., & Wei, H. (2020). Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(20), 10970-10975. <https://doi.org/10.1073/pnas.2005615117>
- Yang, Y., Shen, C., Li, J., Yuan, J., Wei, J., Huang, F., Wang, F., Li, G., Li, Y., Xing, L., Peng, L., Yang, M., Cao, M., Zheng, H., Wu, W., Zou, R., Li, D., Xu, Z., Wang, H., . . . Liu, Y. (2020). Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *J Allergy Clin Immunol*, 146(1), 119-127.e114. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.027>
- Yoshikawa, T., Hill, T., Li, K., Peters, C. J., & Tseng, C. T. (2009). Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus-induced lung epithelial cytokines exacerbate SARS pathogenesis by modulating intrinsic functions of monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Virol*, 83(7), 3039-3048. <https://doi.org/10.1128/jvi.01792-08>
- Zang, J., Ye, J., Zhang, C., Sha, M., & Gao, J. (2019). Senescent hepatocytes enhance natural killer cell activity via the CXCL-10/CXCR3 axis. *Exp Ther Med*, 18(5), 3845-3852. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8037>
- Zhang, D., Guo, R., Lei, L., Liu, H., Wang, Y., Wang, Y., Qian, H., Dai, T., Zhang, T., Lai, Y., Wang, J., Liu, Z., Chen, T., He, A., O'Dwyer, M., & Hu, J. (2021). Frontline Science: COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J Leukoc Biol*, 109(1), 13-22. <https://doi.org/10.1002/jlb.4hi0720-470r>
- Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol*, 50, 173-182. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010>
- Zhang, S., Bai, W., Yue, J., Qin, L., Zhang, C., Xu, S., Liu, X., Ni, W., & Xie, M. (2021). Eight months follow-up study on pulmonary function, lung radiographic, and related physiological characteristics in COVID-19 survivors. *Sci Rep*, 11(1), 13854. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93191-y>
- Zhao, J. Y., Yan, J. Y., & Qu, J. M. (2020). Interpretations of "Diagnosis and Treatment Protocol for Novel Coronavirus Pneumonia (Trial Version 7)". *Chin Med J (Engl)*, 133(11), 1347-1349. <https://doi.org/10.1097/cm9.0000000000000866>

# 10. ANEXO-1

## Figuras complementarias.

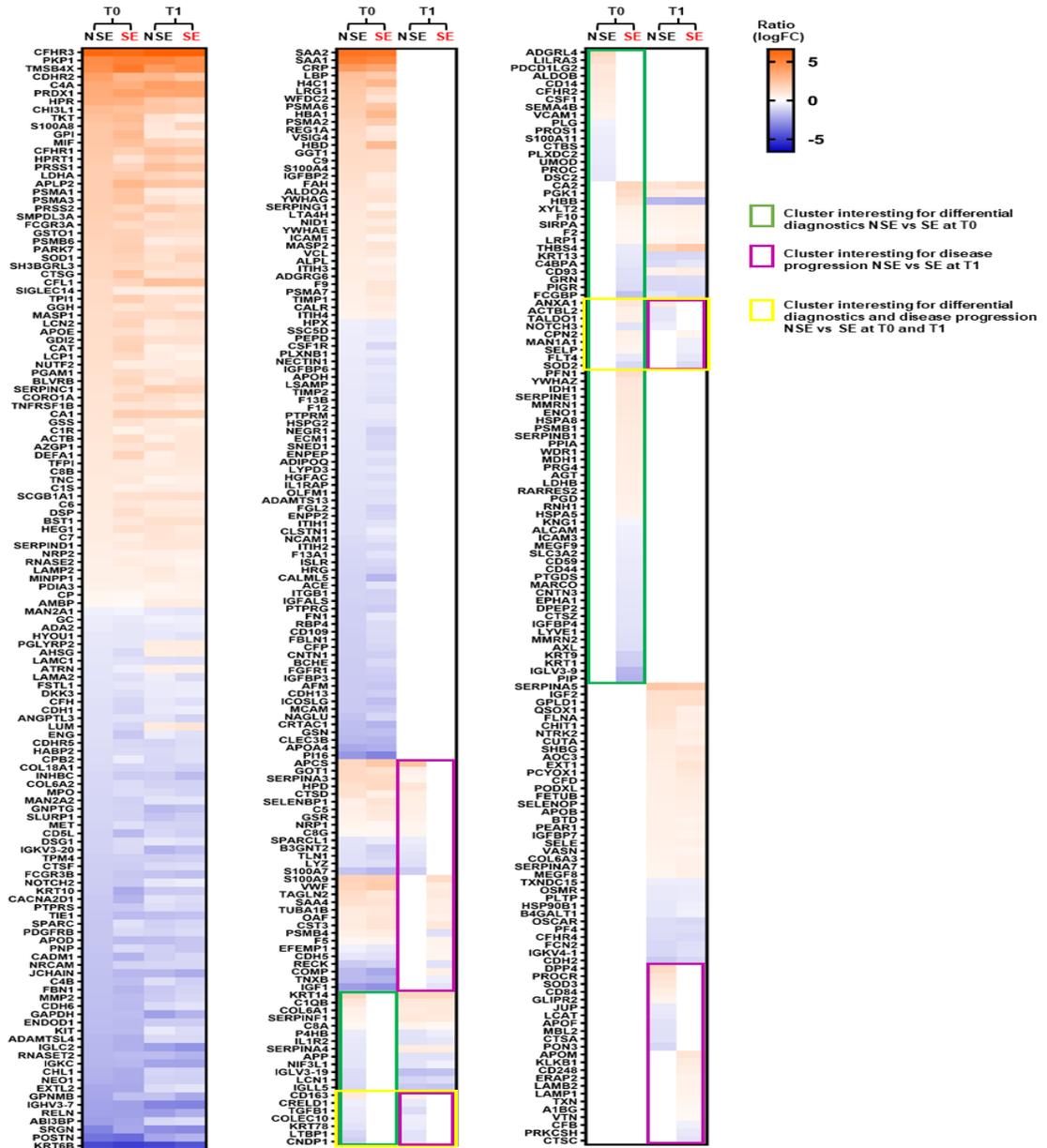


FIGURA 42. Figura complementaria 1.

Análisis de resultados de proteoma organizados por patrones donde se representan las vías activas (naranja) e inhibidas (azul) en los individuos con TCT alterada (N-SE) e individuos con DPLP (SE) durante la etapa aguda (T0) y 4 meses post COVID-19 (T1).

## 11. ANEXO-2

### **Características del grupo en estudio.**

Se incluyeron 60 pacientes con edad  $\geq$  18 años, con diagnóstico confirmado de infección por SARS-CoV-2 mediante PCR durante los meses de abril a julio de 2020. Los pacientes debían contar con registro clínico y seguimiento durante la fase aguda de la enfermedad por COVID-19. Se incluyeron pacientes con COVID-19 de severidad leve (n=18, sintomáticos, sin diagnóstico de neumonía o hipoxemia), moderada (n=17, sintomáticos, con diagnóstico de neumonía que requirió hospitalización, sin conexión a ventilación mecánica invasiva (VMI)) y severa (n=25, hipoxemia severa, con necesidad de VMI y estaba en Unidad de cuidados intensivos (UCI)). Se excluyeron aquellos pacientes con comorbilidad respiratoria previa (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, otra), pacientes mayores de 70 años, además de participantes con pérdida de seguimiento, historia de trasladado a otro hospital o ciudad posterior al alta, aquellos en cuidados paliativos o que tuvieran una discapacidad mental que impidiera completar las evaluaciones. Además, se incluyeron 10-12 potenciales individuos control que no presentaron COVID-19 confirmado por PCR negativo semanal y ausencia de anticuerpos anti-SARS-CoV2 al momento de toma de muestra.

## 12. ANEXO-3

### Consentimiento comité ético científico del servicio de salud BIOBIO.



Nº 98

Ref.: Respuesta Solicitud de Aprobación Protocolo  
"Neumonía Viral Secundaria a Corona Virus en el  
Complejo Asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz"

Los Ángeles, 06 de Abril de 2020

A: Investigador Principal Sr. Gonzalo Labarca Trucios

DE: Comité Etico de Investigación

Estimado Investigador:

El Comité Ético Científico del Servicio de Salud Biobío, en su sesión ordinaria de fecha 26.03.2020 ha analizado los antecedentes remitidos por Ud. en relación a solicitud de aprobación protocolo en referencia, resolviendo lo siguiente:

1. **Valor del estudio:** La investigación aportara nuevos antecedentes sobre los atributos clínicos del COVID-19, perfiles demográficos de los pacientes con diagnóstico de neumonía, desenlaces a corto y largo plazo según nivel de severidad del cuadro. Acumulando evidencia objetiva, que a futuro contribuirá a reforzar las medidas de prevención primaria y de manejo posterior de pacientes hospitalizados con diagnóstico de neumonía secundario a Covid-19 en un establecimiento de salud pública a nivel local.

1. **Validez científica:** Estudio observacional, prospectivo de corte transversal.

2. **Discriminación arbitraria:** Se ajusta a criterios de inclusión y exclusión delimitados en el marco de la investigación.

3. **Relación riesgo-beneficio:** La probabilidad de que ocurra un efecto nocivo a consecuencia de la implementación de la investigación es baja.

4. **Consentimiento informado:** Se debe ajustar a lo indicado los artículos 8º, 10º, 14º y 15º de la Ley Nº 20.584 sobre consentimiento informado (CI) con sus exigencias y excepciones y el Derecho de las personas a decidir informadamente.



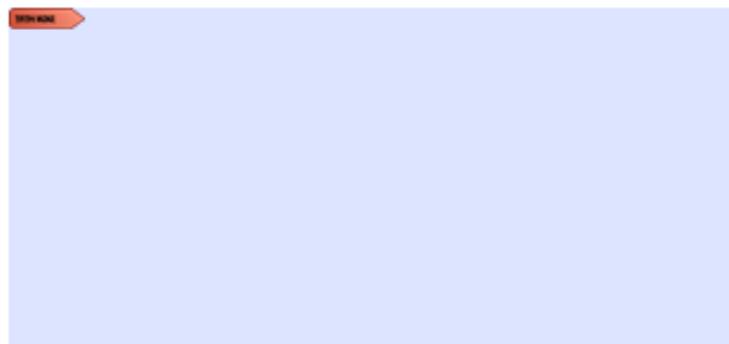
**EN CONSECUENCIA,**

En virtud de los antecedentes tenidos a la vista, y toda vez que el procedimiento puesto en marcha, se ajuste a los artículos mencionados en el punto 4, este Comité ha resuelto "aprobar" la realización del protocolo de investigación en referencia.

Tomó conocimiento de:

- ✓ Formulario Acceso CEC.
- ✓ Protocolo de Investigación.
- ✓ Consentimiento Informado.
- ✓ Carta de autorización de: Director Complejo Asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz.
- ✓ Currículo Vitae Investigador Principal.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,



**CARLOS VILLARROEL INOSTROZA  
PRESIDENTE  
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO**

En respuesta a su solicitud el CEC (Comité Ético Científico) se reunió en sesión ordinaria con fecha 26.03.2020 estando presente Dr. Carlos Villarroel, A.S (MC) Patricia Messenger, E.U. Cecilia Alvarado y B.G. Felipe Riquelme.

**DISTRIBUCION:**

- Interesado.
- Archivo

## Consentimiento Comité Ética, Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción.



Universidad de Concepción  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo  
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

CEBB 676-2020.

Concepción, julio de 2020.

**CERTIFICADO**

El Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Concepción ha revisado el PROYECTO CÓDIGO COVID1005, adjudicado en la CONVOCATORIA DE LA SUBDIRECCIÓN DE REDES, ESTRATEGIA Y CONOCIMIENTO - AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO 2020, titulado "EL EFECTO COLATERAL DE LA DEFENSA FRENTE AL COVID-19: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU ASOCIACIÓN CON UN POTENCIAL DAÑO PULMONAR EN PACIENTES RECUPERADOS QUE CURSARON COVID-19 SEVERO, MODERADO Y ASINTOMÁTICO", presentado por la DRA. ESTEFANÍA NOVA LAMPERTI, en calidad de Investigadora Responsable, académica adscrita al Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, comprobando que cumple con las normas y principios éticos y bioéticos y con los procedimientos de bioseguridad, establecidos nacional e internacionalmente para investigación científica que contempla manipulación de material biológico de origen humano (sangre) y sus residuos, tanto biológicos como químicos, así también datos de salud.

Considerando que los casos de personas con infección por SARS-CoV-2 leve o moderada y los casos de pacientes hospitalizados con infecciones severas en nuestra población chilena es relevante en el contexto actual de emergencia sanitaria por la pandemia declarada por la Organización Mundial de la Salud (marzo/2020), los estudios contemplados en el marco de este proyecto de investigación suponen analizar la respuesta inmune efectiva a SARS-CoV-2 en pacientes recuperados a COVID-19 a 1, 2 y 10 meses post infección. Para esto buscará determinar la asociación entre mecanismos inmunológicos humorales y celulares y parámetros inflamatorios sistémicos con un potencial daño pulmonar a corto y mediano plazo en una cohorte de pacientes que cursaron COVID-19 con cuadro asintomático, moderado o severo, conforme se indica como objetivo general.

El desarrollo metodológico del PROYECTO CÓDIGO COVID1005 detalla de manera rigurosa la ejecución de las actividades descritas en 05 (cinco) objetivos específicos, a saber: inicialmente pretende medir el título y la especificidad de anticuerpos anti-SARS-CoV-2 de clase IgG/IgM en una cohorte de 50 pacientes recuperados de COVID-19 a 1, 2 y 10 meses post infección; después prevé analizar la activación molecular y la producción de citoquinas de neutrófilos, monocitos y linfocitos B en esta muestra de pacientes recuperados para, a continuación, determinar los parámetros sistémicos de inflamación de la misma muestra; con los datos obtenidos propone evaluar la función pulmonar y la progresión del estado

Barrio Universitario s/n,  
Edificio Empreudec  
Fono (56-41) 2204302  
Casilla 160 C - Correo 3, secrevrid@udec.cl  
Concepción, Chile



100 AÑOS  
DE  
DESARROLLO  
LIBRE DEL  
ESPIRITU





Universidad de Concepción  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo  
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

de salud de los pacientes para, finalmente, asociar los parámetros inmunológicos humorales y celulares y parámetros sistémicos de inflamación con la severidad de la patología cursada y un potencial daño pulmonar en la muestra de pacientes.

En este estudio para identificar la asociación entre parámetros inflamatorios celulares y sistémicos y su relación con el daño pulmonar a 1, 2 y 10 meses post-infección, la participación de cada sujeto – pacientes mayores de 18 años, cuya atención fue realizada en el Centro de Salud Familiar (CESFAM) de Hualqui y en el Complejo Asistencial “Dr. Víctor Ríos Ruiz”, de Los Ángeles (Provincia de Concepción y del Biobío), que desarrollaron COVID-19 asintomático (n=10), moderado (n=20) o severo (n=20), provenientes del sistema público como privado, urbano y rural, además de controles sanos (n=10) desde el Laboratorio Clínico PreveGen de Concepción- estará basada en el proceso de Consentimiento Informado. Este proceso será documentado, conforme modelo presentado a este Comité institucional, y regularmente firmado.

Para el estudio, observacional de carácter básico-traslacional, se requiere la obtención de datos clínicos y por esto se realizará la toma de muestra de sangre de los participantes, las que se utilizarán para hemograma, inmunofenotipo y ensayos funcionales, y la fracción de suero, para medir anticuerpos y parámetros sistémicos de inflamación. Aún considera el estudio de la función respiratoria y evolución clínica que se realizará mediante un examen por tomografía computarizada de torax de alta resolución, espirometría basal y posterior a broncodilatación. Además, se entregarán encuestas generales del estado de salud con escala de depresión de BECK, escala de ansiedad y ánimo de HDAS y formulario de calidad de vida mediante *Saint George Respiratory Questionnaire*. Por último, prevé estudio de sueño con la escala de Epworth y una poligrafía respiratoria + Actigrafía.

Toda la información y los resultados de los estudios enmarcados en este PROYECTO CÓDIGO COVID1005, serán custodiados por la Investigadora Responsable, Dra. Estefanía Nova Lamperti.

La ejecución de las actividades descritas en el proyecto en pauta asegura que no vulnera los derechos y la dignidad de los participantes en el estudio, garantizando la autonomía, la libertad, la voluntariedad y la privacidad de los mismos, presentando para ello los métodos de protección que aseguran la confidencialidad de los datos de investigación y de custodia estricta de la información obtenida, observando todas las características formales y necesarias para su validez.

Todos los aspectos del trabajo metodológico, se encuentran detalladamente descritos en la propuesta del proyecto y las actividades serán realizadas por el personal científico, profesional y de apoyo del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción y de las instituciones asociadas. El equipo de investigadores de la Universidad de Concepción cuenta con la calificación y destrezas necesarias para llevar a buen término los diferentes ensayos que se tiene contemplado, bajo la rigurosa aplicación de protocolos de trabajo establecidos y de carácter rutinario en las respectivas dependencias de nuestra Casa de Estudios superiores. Por tanto, si bien se utilizará material biológico y químico para los estudios previstos en la propuesta, su respectiva manipulación estará bajo los cuidados adecuados y necesarios, así como también observando las normas pertinentes.

Barrio Universitario s/n,  
Edificio Empreudec  
Fono (56-41) 2204302  
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrid@udec.cl  
Concepción, Chile



100 AÑOS  
DE  
DESARROLLO  
LIBRE DEL  
ESPIRITU



Universidad de Concepción  
Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo  
Comité de Ética, Bioética y Bioseguridad

El tratamiento y disposición de los residuos biológicos y químicos generados en el desarrollo del presente proyecto dentro del Laboratorio de Inmunología Molecular e Translacional, en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, proyecto de investigación titulado "EL EFECTO COLATERAL DE LA DEFENSA FRENTE AL COVID-19: ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU ASOCIACIÓN CON UN POTENCIAL DAÑO PULMONAR EN PACIENTES RECUPERADOS QUE CURSARON COVID-19 SEVERO, MODERADO Y ASINTOMÁTICO" observa los derechos asegurados en la Declaración Universal de los Derechos Humanos, los derechos y principios de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos, las Normas Éticas de la Organización Panamericana de la Salud para Investigaciones con Sujetos Humanos, la Constitución de la República de Chile, la Ley N° 20.120 "Sobre la Investigación Científica en el Ser Humano, su Genoma y Prohíbe la Clonación Humana", la Ley N° 20.584 que "Regula los derechos y deberes que tienen las personas en relación con acciones vinculadas a su atención en salud" y la Ley N° 19.628, "Sobre Protección de la Vida Privada". Así también, sigue las Sugerencias para Escribir un Consentimiento Informado en Estudios con Personas, del Comité Asesor de Bioética FONDECYT/CONICYT. Además, cumple con el Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados (Versión 2018), normas formalizadas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica – CONICYT y adoptadas por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo – ANID, con el Reglamento de Manejo de Residuos Peligrosos de la Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos de la Universidad de Concepción y su respectivo Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL), así también con los principios y normas obligatorias delineadas con base en la Declaración de Singapur sobre la Integridad en la Investigación (2010) para investigadores de proyectos CONICYT, (conforme lo establecido por la Resolución Exenta N° 157, del 24 de enero de 2013) y no muestra elementos que puedan transgredir las normas y principios éticos rectores de nuestra Institución Universitaria, este Comité resuelve aprobarlo, confirmando el presente Certificado.



DRA. M. ANDREA RODRÍGUEZ TASTETS  
PRESIDENTA

COMITÉ DE ÉTICA, BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO  
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Barrio Universitario s/n,  
Edificio Empreudec  
Fono (56-41) 2204302  
Casilla 160 C – Correo 3, secrevrld@udec.cl  
Concepción, Chile



100 AÑOS  
DE  
DESARROLLO  
LIBRE DEL  
ESPIRITU

## **13. ANEXO-4**

### **Manejo de residuos.**

Los residuos generados durante el proyecto, ya sean biológicos o químicos, serán eliminados mediante el medio oficial de la Universidad de Concepción para la eliminación de residuos con el Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos (MATPEL).