



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

**ASOCIACIÓN DE CITOQUINAS CON SECUELAS
FUNCIONALES DEL PULMÓN EN PACIENTES
RECUPERADOS DE COVID-19.**

POR SERGIO ANDRÉS SANHUEZA NOVOA

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico.

Profesor guía y patrocinante

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

Profesor co-guía

Dr. Gonzalo Patricio Labarca Trucios
Médico internista
Complejo asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz
Los Ángeles

**NOVIEMBRE, 2021
CONCEPCIÓN, CHILE**

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

*Dedicado a mi familia y Constanza.
Por ser un apoyo incondicional, sin ellos nada es posible.*

AGRADECIMIENTOS

Comienzo por agradecer a cada docente que formó parte de mi formación como profesional, aportando con sus conocimientos y consejos en este largo camino que recién comienza. En especial a la Dra. Estefanía Nova Lamperti, quien continúa guiando mi aprendizaje, siempre con respeto, paciencia y una gran demostración de liderazgo, compartiendo sus conocimientos y transmitiendo alegría en todo momento. Quiero agradecer también, al Dr. Enrique Guzmán Gutiérrez, por ser mi primer tutor dentro del área de la investigación clínica y siempre hacerme sentir cómodo y entusiasta dentro del laboratorio.

De igual forma, me parece primordial agradecer a cada una de mis amistades que he formado en este periodo universitario, su compañía dentro y fuera de las aulas de clases siempre fue grata y estoy seguro de que estarán conmigo por mucho tiempo más.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1.- Reconocimiento del virus SARS-CoV-2 y sus características patológicas.	14
1.2.- Tormenta de citoquinas y progresión en la gravedad de la COVID-19.	19
1.3.- Desregulación del perfil inmunológico de pacientes infectados.	25
1.4.- Relación entre el ambiente inflamatorio y las afecciones pulmonares.	30
2. PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	36
3. HIPÓTESIS.....	37
4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5. NOVEDAD CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.....	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1.- Recopilación de muestras.	41
6.2.- Recopilación de parámetros clínicos.	42
6.3.- Cuantificación de quimioquinas y citoquinas.	43
6.4.- Obtención de la evaluación del daño estructural del pulmón mediante Tomografías computarizadas de tórax.	46
6.5.- Obtención de la evaluación del daño en la funcionalidad pulmonar mediante Espirometría y DLCO.....	48
6.6.- Trabajo estadístico.	49
7. RESULTADOS.....	51
7.1) Análisis de data intrahospitalaria.	51
7.2) Secuelas pulmonares	60
7.2.1) Análisis de tomografías computarizadas de tórax.	60

7.2.2) Análisis de espirometría y DLCO.	66
7.3.1) Cuantificación de citoquinas del periodo activo de la COVID-19.	69
7.3.2) Cuantificación de citoquinas del periodo de recuperación de la COVID-19.	76
9. DISCUSIÓN	98
10. CONCLUSIÓN	108
11. GLOSARIO	109
12. BIBLIOGRAFÍA	110
13. ANEXO-1	120
Consentimiento del Comité Ético Científico del Servicio Salud Biobío.	120
Consentimiento Comité Ética, Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Concepción.....	122
14. ANEXO-2	125
Manejo de residuos.	125
15. ANEXO-3	126
Características del grupo de estudio.	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6-1. Distribución de diluciones estándar en los tubos control.	45
Tabla 7-1. Desglose de la gravedad de 60 pacientes que componen el grupo de estudio.	53
Tabla 7-2. Edad promedio y sexo de los pacientes que componen el grupo en estudio.	55
Tabla 7-3. Número de pacientes con comorbilidades previas a la COVID-19 y su sintomatología al momento del diagnóstico.	57
Tabla 7-4. Parámetros de laboratorio de los pacientes que componen el grupo en estudio.	59
Tabla 7-5. División de los pacientes según la severidad con la que padecieron la COVID-19 en su etapa activa y la presencia de un TSS mayor o igual a 1, obtenido durante la etapa de recuperación de los pacientes.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Tomografía computarizada de tórax.....	18
Figura 1-2. Esquema explicativo de la respuesta de células epiteliales alveolares frente al virus SARS-CoV-2.	20
Figura 1-3. Cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ	23
Figura 1-4. Seguimiento a los marcadores de agotamiento de células T.	28
Figura 1-5. Cuantificación total de células T, células T CD-4 ⁺ y células T CD-8 ⁺ por parte de dos estudios diferentes.	29
Figura 1-6. TCT de paciente infectado por SARS-CoV-2.	32
Figura 1-7. Cuantificación y comparación de IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ	34
Figura 1-8. Cuantificación y comparación de células CD3 ⁺ CD8 ⁺ y CD3 ⁺ CD4 ⁺ . 35	
Figura 6-1. Esquema del trabajo estadístico según los diferentes parámetros comparables.	50
Figura 7-1. Distribución de los pacientes según su TSS correspondiente a las TAC.....	63
Figura 7-2. Comparación estadística sobre los TSS de cada paciente.....	65
Figura 7-3. Distribución de los pacientes según los test espirometría y DLCO. 67	
Figura 7-4. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 entre etapa activa y de recuperación.....	71
Figura 7-5. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 entre la etapa activa y de recuperación.	73

Figura 7-6. Comparación estadística de los niveles de IL-12, TNF, IL-1 β y CCL-2 entre la etapa activa y de recuperación.	75
Figura 7-7. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según el desarrollo de SARS.	79
Figura 7-8. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 12 meses según el desarrollo de SARS.	80
Figura 7-9. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según las TCT.	83
Figura 7-10. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 12 meses según las TCT.	84
Figura 7-11. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 y 12 meses según espirometría.	87
Figura 7-12. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según las TCT.	90
Figura 7-13. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 12 meses según test DLCO.	91
Figura 7-14. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según los test de funcionalidad pulmonar obtenidos a los 12 meses.	94
Figura 7-15. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según la recuperación de la funcionalidad pulmonar a los 12 meses. ..	97

RESUMEN

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus-2 (SARS-CoV-2) es el agente etiológico de la enfermedad por Coronavirus 2019 (COVID-19). La patología puede desarrollarse con distinta severidad entre los pacientes, desde una etapa leve, moderada a severa, siendo característico entre los enfermos críticos una marcada liberación de proteínas inflamatorias y el desarrollo del síndrome respiratorio agudo severo (SARS), el cual sigue siendo hasta el día de hoy la principal complicación médica en los infectados. Con el paso del tiempo la COVID-19 severa se ha asociado con secuelas pulmonares sostenidas después de la fase aguda, sin embargo, los mediadores inflamatorios asociados con la disfunción pulmonar tras superar la COVID-19 siguen siendo desconocidos. El objetivo de este estudio fue identificar citoquinas y quimioquinas asociadas con disfunción pulmonar 6 y 12 meses post-COVID-19 en pacientes con enfermedad leve, moderada y severa. Para aquello se reclutaron 60 pacientes COVID-19 del Hospital Víctor-Ríos-Ruiz, 6 y 12 meses después de la fase aguda, obteniendo en estos periodos de tiempo muestras de suero para determinar 6 citoquinas y 4 quimioquinas. La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando un ensayo de array por citometría de flujo. Las secuelas respiratorias de los pacientes post-COVID-19 se analizaron midiendo el daño estructural del pulmón a través de tomografías computarizadas de tórax (TCT), además de analizar las secuelas

funcionales del pulmón a través de los exámenes de espirometría y difusión de monóxido de carbono pulmonar (DLCO).

Nuestros datos mostraron que 22 pacientes presentaban deterioro de la función pulmonar 6 meses después de la infección por COVID-19. Luego de identificar a los pacientes con secuelas pulmonares, observamos que CXCL-9, CXCL10 e IL-6 fueron los principales mediadores inflamatorios asociados con la disfunción pulmonar a los 6 meses. Finalmente, del grupo de pacientes con secuelas funcionales a nivel pulmonar a los 6 meses, comparamos la presencia de citoquinas entre los pacientes que recuperaron la función pulmonar a los 12 meses y los pacientes que mantuvieron disfunción pulmonar, observando que los niveles de CXCL-9, CXCL10 e IL-6 a los 6 meses aumentaron en el grupo de pacientes que mantuvieron la disfunción pulmonar 12 meses después del COVID-19. De esta forma es que los niveles elevados de CXCL-9, CXCL-10 e IL-6 se asocian con secuelas en la funcionalidad pulmonar a largo plazo después de COVID-19. Volviéndose interesante estudiar, en investigaciones a futuro, el mecanismo patológico por el cual estas proteínas inflamatorias logran contribuir a la disfunción pulmonar en los pacientes que superan la patología.

ABSTRACT

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is the etiological agent of Coronavirus disease 2019 (COVID-19). The pathology can develop with different severity among patients, from a mild, moderate to severe stage, being characteristic among critically ill patients a marked release of inflammatory proteins and the development of severe acute respiratory syndrome (SARS), which remains to this day the main medical complication in those infected. Over time, severe COVID-19 has been associated with sustained lung sequelae after the acute phase, however, the inflammatory mediators associated with lung dysfunction after overcoming COVID-19 remain unknown. The objective of this study was to identify cytokines and chemokines associated with pulmonary dysfunction 6 and 12 months post-COVID-19 in patients with mild, moderate and severe disease. For this, 60 COVID-19 patients were recruited from the Víctor-Rios-Ruiz Hospital, 6 and 12 months after the acute phase, obtaining serum samples in these periods of time to determine 6 cytokines and 4 chemokines. Protein quantification was performed using a flow cytometric array assay. The respiratory sequelae of post-COVID-19 patients were analyzed by measuring the structural damage of the lung through computed tomography of the chest (CTT), in addition to analyzing the functional sequelae of the lung through spirometry and diffusing capacity of the lungs for carbon monoxide (DLCO).

Our data showed that 22 patients had impaired lung function 6 months after COVID-19 infection. After identifying the patients with pulmonary sequelae, we observed that CXCL-9, CXCL10 and IL-6 were the main inflammatory mediators associated with pulmonary dysfunction at 6 months. Finally, from the group of patients with functional sequelae at the lung level at 6 months, we compared the presence of cytokines between the patients who recovered lung function at 12 months and the patients who maintained lung dysfunction, observing that the levels of CXCL-9, CXCL-10 and IL-6 at 6 months increased in the group of patients who maintained pulmonary dysfunction 12 months after COVID-19. Thus, elevated levels of CXCL-9, CXCL-10, and IL-6 are associated with long-term sequelae in lung function after COVID-19. It is becoming interesting to study, in future research, the pathological mechanism by which these inflammatory proteins contribute to pulmonary dysfunction in patients who overcome the pathology.

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, Z. *et al.*, 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, F. *et al.*, 2020.). El virus posteriormente alcanzó características pandémicas, diseminándose por el mundo con una alta tasa de transmisibilidad, alcanzando actualmente más de doscientos treinta millones de personas infectadas y casi cinco millones de personas fallecidas, siendo países como Estados Unidos, India y Brasil los más afectados en cuanto a la propagación viral (Información extraída de Universidad Johns Hopkins, Baltimore, EE.UU.).

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 (Cui *et al.*, 2020 y Corman *et al.*, 2018). 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 un tamaño completo de 1273 aminoácidos, una nucleocapside de ARN y glicoproteínas ancladas a su envoltura que le permiten interaccionar con su receptor funcional e infectar las células de su organismo huésped (Hu *et al.*, 2020.).

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**) (Sanchez *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 y Jain *et al.*, 2020). La sintomatología de la enfermedad es variada, los más clásicos son la fiebre, tos seca y fatiga, pero también existen casos que presentan características diferentes como 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, Z., *et al.*, 2020). Toda esta sintomatología y la enfermedad en general puede tener un aumento significativo en cuanto a la velocidad con la que progresa 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 Z *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).

1.2.- Tormenta de citoquinas y progresión en la gravedad de la COVID-19.

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 cual comienza *per se* al momento de que la proteína viral spike (S), ubicadas en la membrana del virus, hacen contacto con su receptor funcional la enzima convertidora de angiotensinas 2 (ECA-2) en las células epiteliales alveolares del pulmón. Una vez allí, se comienza a genera una respuesta tanto a nivel extra-celular como intra-celular (**Figura 2**), las cuales desencadenarán un aumento exacerbado de diversas citoquinas (Hong *et al.*, 2020 y Dayarathna *et al.*, 2020).

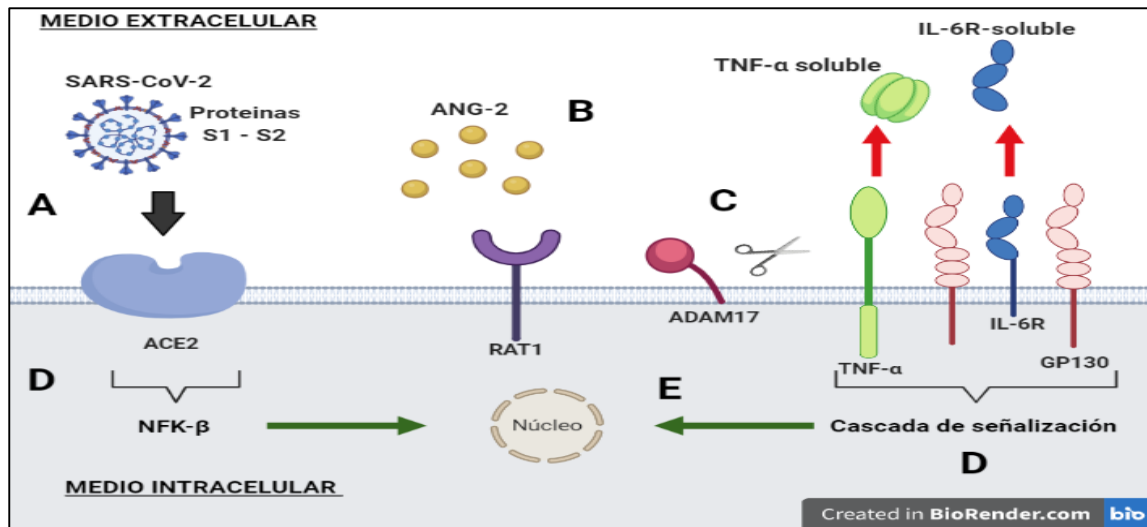


FIGURA 2. Esquema explicativo de la respuesta de células epiteliales alveolares frente al virus SARS-CoV-2.

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- β , como también se activan cascadas de señalización por la comunicación celular mediante la interacción de proteínas inflamatorias circulantes, como IL-6 o TNF- α , 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) 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, Shang *et al.*, 2020, Letko *et al.*, 2020 y Walls *et al.*, 2020.). De esta forma es que extracelularmente, se comienza a acumular la angiotensina 2 producto de que la partícula viral se encuentra utilizando su lugar en la ECA-2. Esto es censado por la célula, activando la proteasa ADAM-17 que se encargará mediante procesos proteolíticos de cortar ciertas proteínas, como TNF- α y receptores de citoquinas, las que se encuentran ancladas a la membrana de la célula, para así liberarlas al medio y sirvan como 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 NFK- β , que en conjunto con las señales citoquímicas proporcionadas por las células vecinas, efectúan su capacidad, mediante cascadas de señalización, de translocar estas señales inflamatorias al núcleo, en el cual comienza una transducción de proteínas inflamatorias, principalmente citoquinas (**Figura 2**). (Hoffmann *et al.*, 2020, Shang *et al.*, 2020, Letko *et al.*, 2020 y 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- α e IFN- γ (**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, terminando por ser 48 pacientes graves y 31 pacientes leves, los cuales no presentaron diferencias significativas en cuanto a sus niveles de citoquinas al momento del ingreso al hospital (Song *et al.*, 2020).

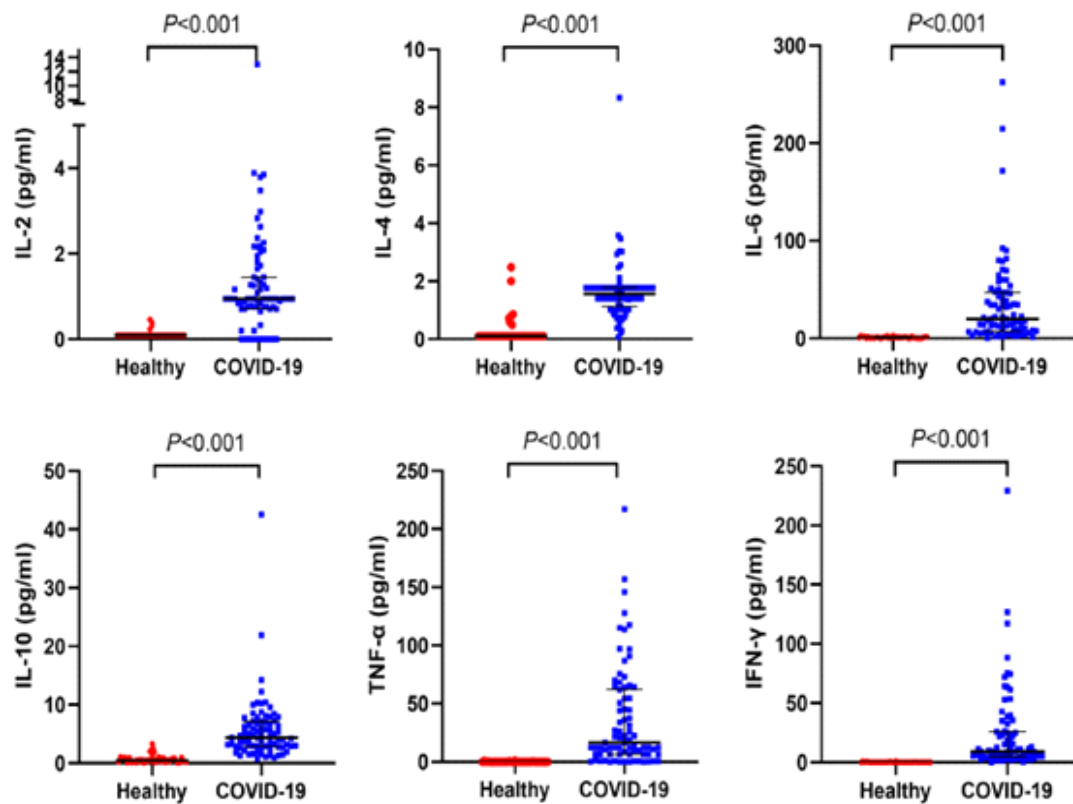


FIGURA 3. Cuantificación de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ.

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).

Estas citoquinas aumentan progresivamente en cantidad a medida que la patología se desarrolla, alcanzando los niveles más altos en los pacientes críticos y fallecidos (Wilk *et al.*, 2020). Por otra parte, en un estudio de cohorte de 308 pacientes realizado por Liu y colaboradores, utilizando datos del Hospital Tongji, Universidad de Ciencia y Tecnología de Huazhong (Wuhan, China), donde 138 pacientes habían muerto, mientras que 170 se habían recuperado y fueron dados de alta del hospital, fue posible determinar que IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α y el receptor de IL-2 se encontraban en niveles 2 a 20 veces mayores en pacientes que murieron en comparación con los que se recuperaron, concluyendo que las citoquinas son relevantes para predecir la gravedad de COVID-19 y ayudan a distinguir a los pacientes críticamente enfermos de los menos afectados (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, sobre lo cual aún no se tienen comprendidos a cabalidad los mecanismos por los que ocurre. Aun así, se ha descrito que la proteína de la nucleocapside viral (N) regula dualmente las respuestas inmunitarias innatas, ya que se asocian los niveles de proteína N con la fosforilación y translocación nuclear de las vías JAK/STAT, siendo estas últimas proteínas encargadas de la regulación y liberación de citoquinas como IL-6 o IFN. La proteína N en bajas concentraciones genera una supresión de la señalización que generan las proteínas inflamatorias, mientras que a dosis altas, lo que podría asociarse a una mayor replicación viral con el paso de los días tras la infección, se genera un aumento en los niveles y la señalización de citoquinas inflamatorias, 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, con ello nos referimos principalmente a macrófagos pulmonares (MP). Estos MP sufren una hiperactivación que no permite el paso a una correcta respuesta inmune adaptativa, viéndose afectada así la activación de linfocitos T (Zhao *et al.*, 2021, Hoffmann *et al.*, 2020 y Tian *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- α/β gracias a los receptores en su superficie, de esta manera el MP genera el factor quimioatrayente 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- α , IL-6 e IL-8 principalmente.), con el fin de combatir el ataque viral detectado, pero provocando un aumento en la severidad del SARS. (Mared *et al.*, 2020 y Yang *et al.*, 2020). Siguiendo la misma línea de liberación de citoquinas es que se ven activados los linfocitos T CD4⁺, convirtiéndose en células T helper (Th1), generando aún más proteínas proinflamatorias (IFN- α , IL-2, TNF- α , factor estimulante de granulocitos, etc.) (Mared *et al.*, 2020 y Wilk *et al.*, 2020). Estas últimas provocan, entre otras cosas, que en los pacientes graves que padecen SARS comience una infiltración hacia el pulmón de monocitos inflamatorios CD14⁺ CD16⁺ los que según estudios se asocian con la producción de IL-6 en altas cantidades, la cual es factor fundamental en el SLC que conlleva a la disfunción del tejido pulmonar y a la descontrolada liberación de citoquinas por monocitos y macrófagos (Zhang *et al.*, 2020)

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⁺ (Mared *et al.*, 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 dado que la infección viral diezma directamente el funcionamiento del bazo y los ganglios linfáticos, infectando 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, 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⁺, 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 4**). Lo concreto, es que los pacientes que cursan con la enfermedad COVID-19 padecen de una marcada linfopenia (**Figura 5-A**), afectando principalmente a las células T CD-8⁺ y es especialmente prominente en los pacientes con la enfermedad en su etapa severa ingresados a UCI (**Figura 5-B**) (Chen *et al.*, 2020).

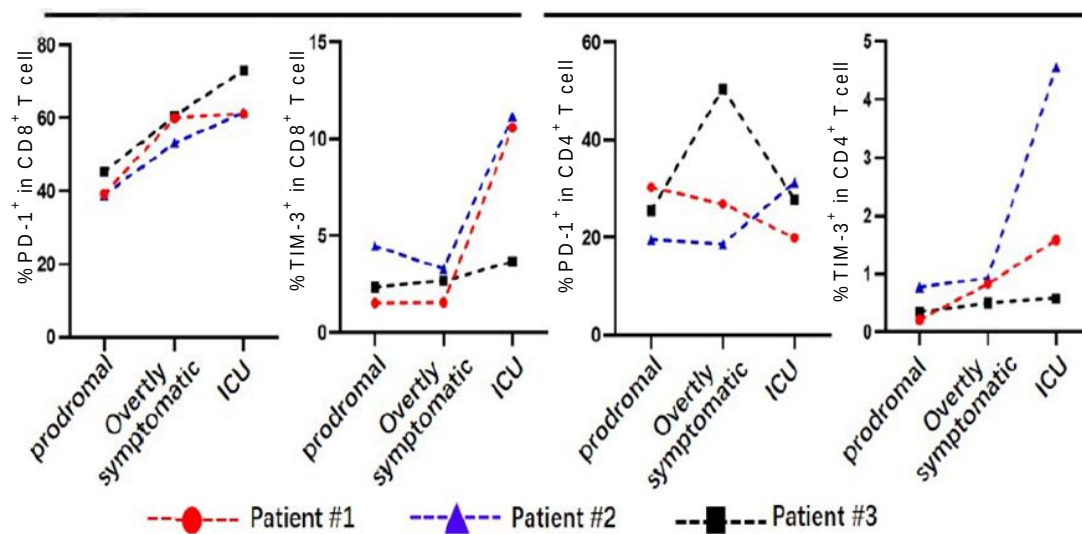


FIGURA 4. Seguimiento a los marcadores de agotamiento de células T.

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 citometria de flujo y análisis FACS (Extraído de Chen, et al., 2020.).

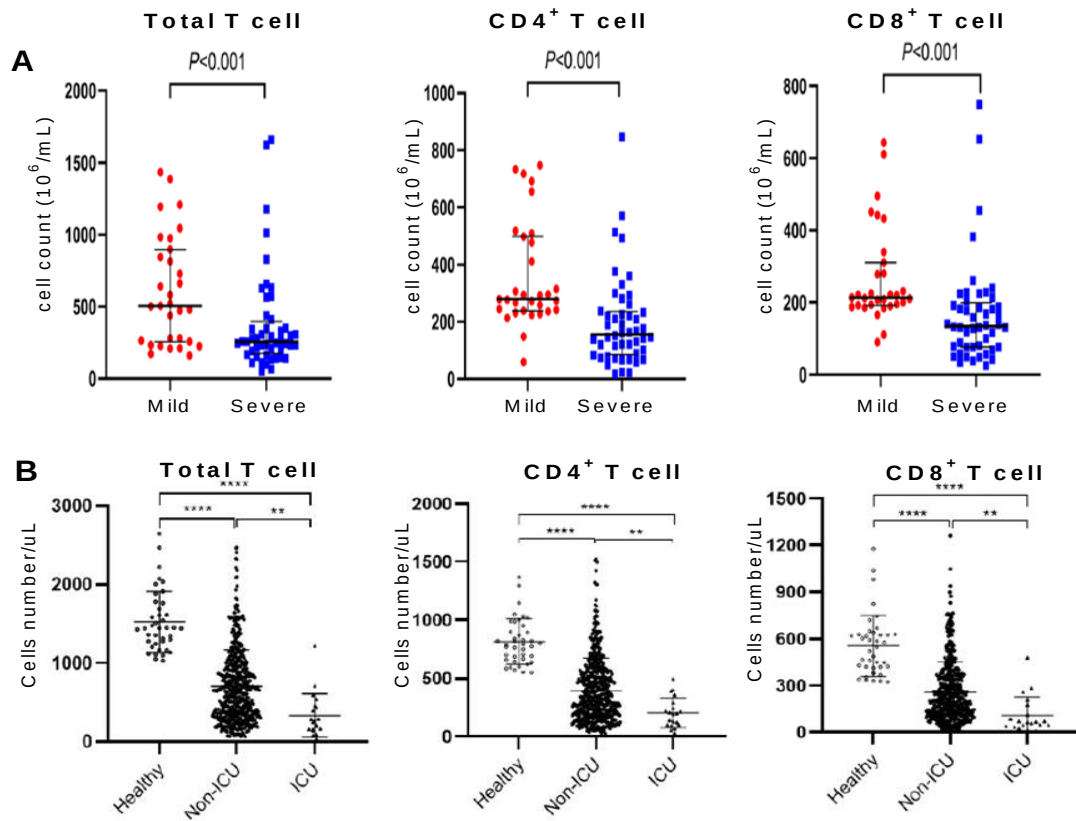


FIGURA 5. Cuantificación total de células T, células T CD-4⁺ y células T CD-8⁺ por parte de dos estudios diferentes.

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.- Relación entre el ambiente inflamatorio y las afecciones pulmonares.

Así es como todo este ambiente inflamatorio a nivel pulmonar tiene como protagonistas a macrófagos desregulados y células T disfuncionales, el primero, liberando grandes cantidades de citoquinas inflamatorias produciendo el síndrome liberador de citoquinas, y el segundo, ayudando en la liberación de quimioquinas e imposibilitado de realizar una correcta eliminación viral dada su disminución en número y funcionalidad. Estos fenómenos terminan por desencadenar el agravamiento de la enfermedad y con ello el progreso del daño a nivel del epitelio pulmonar. 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 (Zhang *et al.*, 2020, Li *et al.*, 2020 y Francone *et al.*, 2020), pero aún las investigaciones son escasas en cuanto a las consecuencias que provoca tal daño a nivel pulmonar durante la infección en pacientes que logran superarla, teniendo en cuenta que existen diferencias en la imagenología de pacientes fallecidos en comparación a pacientes recuperados (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 6)**.

Por otra parte, los pacientes fallecidos mantuvieron siempre una mayor extensión de las anomalías parenquimatosas en comparación al grupo dado de alta, sugiriendo como causa de ésto 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, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y peroxisomas (Wang *et al.*, 2020).

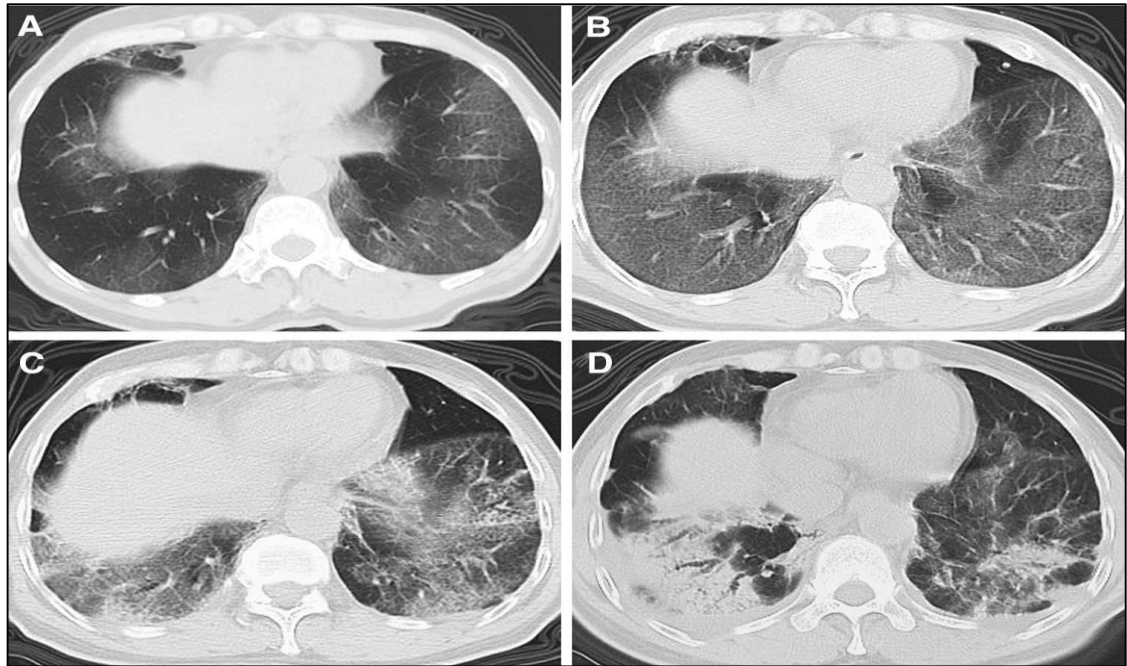


FIGURA 6. TCT de paciente infectado por SARS-CoV-2.

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.).

Lo que es aún más preocupante, es que si bien los niveles de citoquinas como IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ vuelven poco a poco a sus rangos normales después del alta médica, se han detectado casos donde estas citoquinas permanecen elevadas, incluso 14 días después del alta médica (**Figura 7**), mientras que algo similar ocurre con los linfocitos T, pero en un mayor porcentaje de casos, donde la disminución en el número de los linfocitos T se mantiene por semanas luego del alta médica (**Figura 8**). Esto sugiere la necesidad de una observación médica continua después de que los pacientes son dados de alta del hospital (Hasichaolu *et al.*, 2020.).

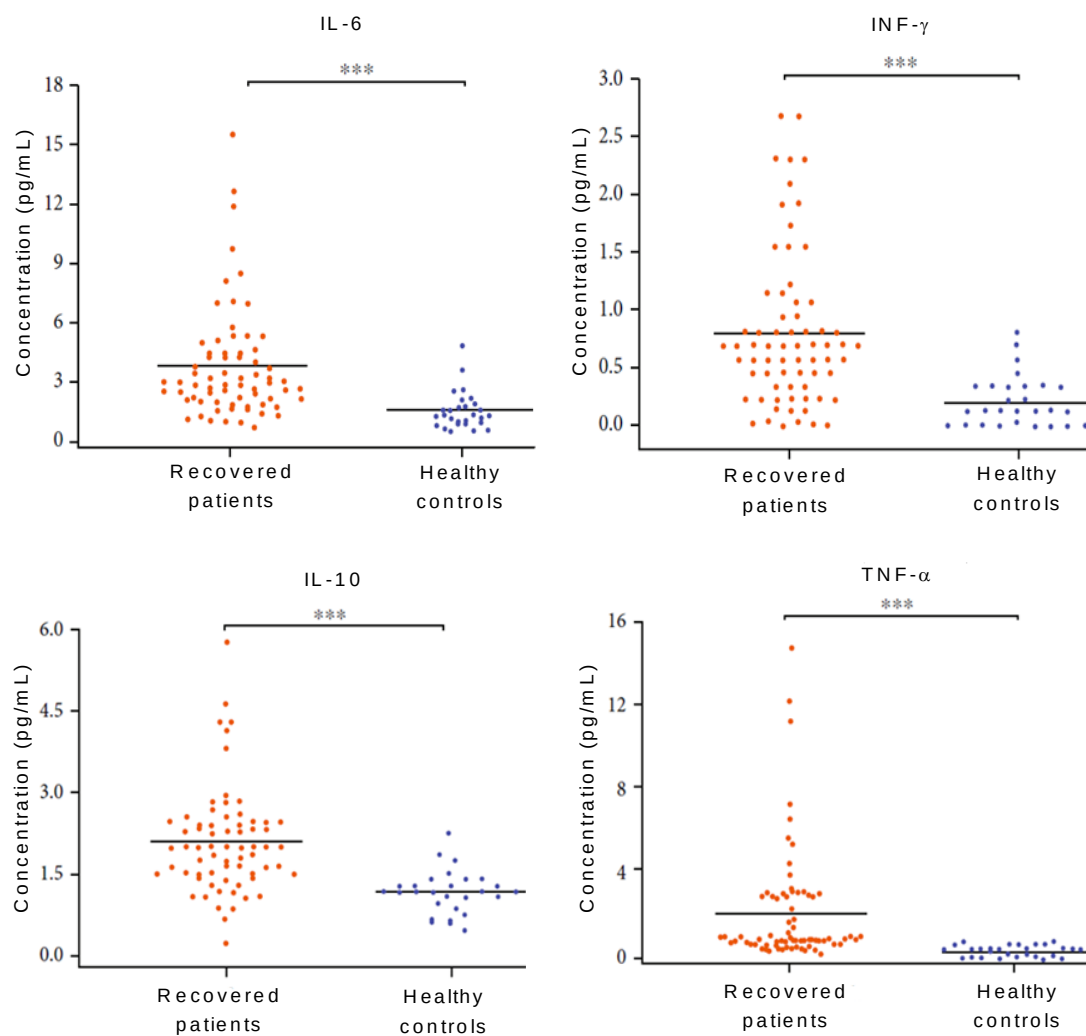


FIGURA 7. Cuantificación y comparación de IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ .

Datos de 68 pacientes que padecieron COVID-19 recuperados (PCR negativo) y 28 personas sanas (previo examen físico). Cuantificación mediante citometría de flujo a partir de muestras de suero (Extraído de Hasichaolu *et al.*, 2020.).

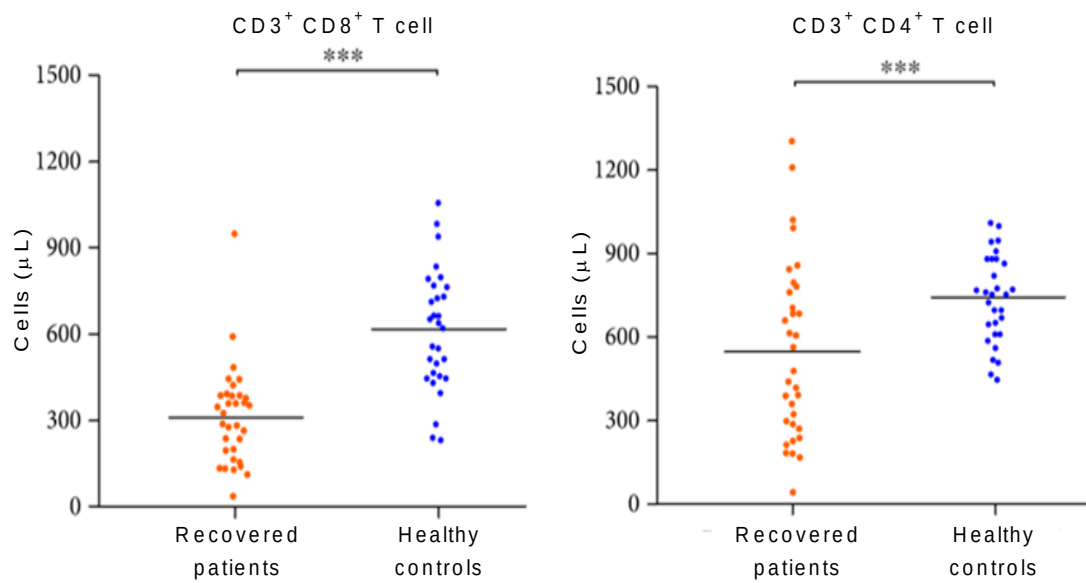


FIGURA 8. Cuantificación y comparación de células CD3⁺CD8⁺ y CD3⁺CD4⁺.

Datos de 33 pacientes que padecieron COVID-19 recuperados (PCR negativo) y 28 personas sanas (previo examen físico). Cuantificación mediante citometria de flujo a partir de muestras de suero (Extraído de Hasichaolu *et al.*, 2020.).

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 principalmente se enfocaron en reconocer en un principio la genética e interacción virus-receptor, dando paso a los estudios para identificar las características inmunológicas que provoca el virus en los pacientes infectados. Actualmente existe poca información de cómo el ambiente inflamatorio producido por las altas concentraciones de citoquinas se relaciona con las secuelas en la funcionalidad pulmonar de los pacientes que cursaron COVID-19 y lograron recuperarse. Generándose así la pregunta de investigación: ¿Qué relación hay entre la producción de citoquinas y las secuelas pulmonares en los pacientes recuperados de la infección por SARS-CoV-2?

3. HIPÓTESIS

La presencia de citoquinas inflamatorias en suero se asocia con secuelas en la función del pulmón en pacientes recuperados que cursaron COVID-19 en sus estados leve, moderado y severo.

4. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la investigación es determinar la asociación de los niveles de citoquinas inflamatorias en suero con secuelas funcionales del sistema respiratorio en pacientes que cursaron COVID-19 en sus estados leve, moderado y severo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1)** Analizar la data intrahospitalaria, además del nivel de secuelas pulmonares en los pacientes recuperados que cursaron COVID-19 en sus estados leve, moderado y severo.

- 2)** Determinar los niveles de citoquinas en suero, tales como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α , además de quimioquinas, como CXCL-10, CCL-2, CXCL9 y CCL5 en personas que no padecieron la patología y en pacientes recuperados que cursaron COVID-19 en sus estados leve, moderado y severo.

- 3)** Asociar los niveles de citoquinas cuantificadas con la data disponible y con las secuelas pulmonares en los pacientes recuperados de la enfermedad.

5. NOVEDAD CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA.

El proyecto está basado en el uso de técnicas científicas ampliamente utilizadas en el último tiempo en diferentes investigaciones, como lo es el marcaje inmune y la citometría de flujo, donde es posible evaluar características fenotípicas de células y proteínas, siendo posible dilucidar así sus funcionamientos. Por otra parte, la investigación se encuentra enmarcada en la situación que actualmente aqueja al mundo con una infección viral de características pandémicas, por lo que se vuelve de suma importancia obtener información científica que ayude, en este caso, a aumentar el conocimiento en post de mejorar el manejo de atención a los pacientes que padecieron la enfermedad COVID-19 y lograron recuperarse.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Recopilación de muestras.

Se realizó una recopilación de muestras sanguíneas de 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. Las tomas de muestras sanguíneas se realizaron a los 6 y 12 meses luego del diagnóstico de la COVID-19.

Además, se obtuvieron muestras de suero de 20 pacientes severos durante la etapa activa de la patología de los 60 pacientes analizados.

También, se recopilaron 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-1**).

6.2.- Recopilación de parámetros clínicos.

Los datos demográficos e intrahospitalarios de los 60 pacientes que componen el grupo en estudio fueron facilitados por parte del complejo asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz, incluyendo datos como: edad, sexo, gravedad de la patología, comorbilidades previas, sintomatología, parámetros sanguíneos de laboratorio y tratamiento médico recibido.

Además, en el reclutamiento de los 60 pacientes a los 6 y 12 meses, a partir de las muestras sanguíneas obtenidas se determinaron parámetros clínicos como: perfil bioquímico completo, grupo sanguíneo y nivel sérico de IgM e IgG anti SARS-CoV-2.

Por otra parte, en el reclutamiento de 6 meses se realizaron exámenes kinesiológicos y otros exámenes como actigrafía, poligrafía, TCT, espirometría y capacidad de difusión de monóxido de carbono pulmonar (DLCO). Mientras que en el reclutamiento de 12 meses, se repitieron en todos los pacientes el examen kinesiológico y sólo se repitieron los test de espirometría y DLCO en los pacientes que presentaron alguno de estos test alterados en el reclutamiento de 6 meses.

6.3.- Cuantificación de quimioquinas y citoquinas.

Se evaluaron citoquinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α , 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* (CBD), uno para la cuantificación de citoquinas y otro para la cuantificación de quimioquinas, ambos se almacenados entre 2 a 8°C.

Los kits se basan en la medición de varias citoquinas a la vez a partir de una misma muestras, 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 sea 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 finalmente gracias a la incubación de la muestra y los componentes del kit se forma un complejo sándwich (perla de captura + analito + reactivo de detección), estos complejos generados se pueden 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 es necesario la realización de estándares, para ello se utilizarán quimiocinas humanas liofilizadas del kit, las cuales deben 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 transferidas 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 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 trataron las perlas de captura añadiendo una alícuota de 2 µl de perlas de captura para cada quimioquina y se agregaron 10 µL a cada estándar. Luego, se añadieron 10 µl del reactivo de detección de quimiocina PE humana a todos los tubos de ensayo y se incubaron los tubos de ensayo durante 3 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Una vez transcurrido el tiempo, los tubos fueron lavados (1500rpm por 10min.) y las muestras fueron resuspendidas en 200 µL

Luego se calibró el citómetro de flujo y se procedió a medir las muestras. El resultado dependerá de la intensidad de la fluorescencia de PE de cada complejo sándwich, revelando la concentración de esa 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. Para la cuantificación de citoquinas se procederá mediante el protocolo de medición de citoquinas, siendo igual al de quimioquinas, se procedió en base al manual de instrucciones *BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Cytokine Kit*.

6.4.- 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 (Ramírez *et al.*, 2008 y Chen *et al.*, 2020.).

En base a esto, se obtuvieron las TCT en el reclutamiento de 6 meses posterior a la alta médica, de los 60 pacientes recuperados de la patología con el fin de evaluar el daño estructural del pulmón. 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 fibroticas y aire atrapado.

El puntaje otorgado por el medico 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 obtiene 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 alcanza sumando los cinco puntajes de los lóbulos y posee un rango de puntajes posibles de 0 a 20 (Cáceres *et al.*, 2020.).

6.5.- Obtención de la evaluación del daño en la funcionalidad pulmonar mediante Espirometría y DLCO.

Para evaluar la funcionalidad pulmonar y obtener la data necesaria del proyecto, se realizaron dos test de funcionalidad en los 60 pacientes recuperados, por parte de un médico que compone el equipo de trabajo. El primer test fue la espirometría, ésta se realizó con un instrumento llamado espirómetro y evaluó las propiedades mecánicas del sistema respiratorio, identificando la obstrucción del flujo aéreo al medir flujos y volúmenes de aire exhalado desde una inspiración máxima (Benítez *et al.*, 2020.). El resultado de este chequeo se consideró como un problema en la funcionalidad pulmonar si correspondía a una funcionalidad menor al 70%. Por otra parte, se realizó el test DLCO, donde 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 *et al.*, 2014.). De esta manera, se consideró que el resultado de DLCO corresponde a una disminución de la funcionalidad pulmonar cuando este era menor al 80% en cuanto a la capacidad de difusión.

6.6.- Trabajo 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 9**) mediante el uso del programa *GraphPad Prism 7*, 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 era menor a 0,05.

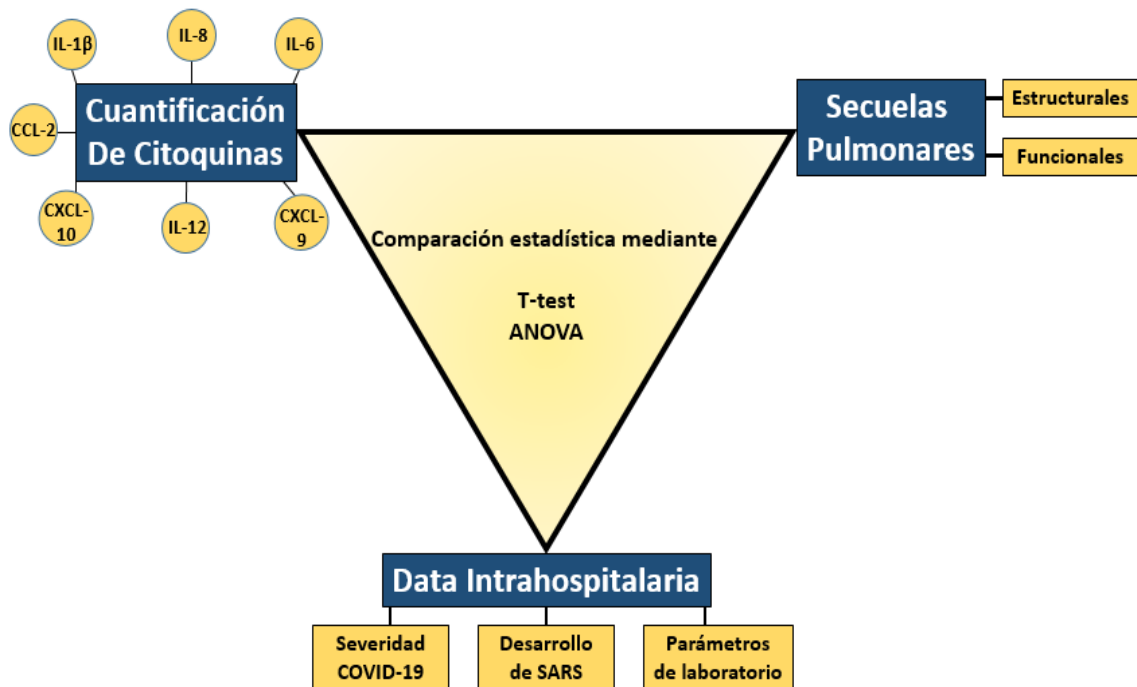


FIGURA 9. Esquema del trabajo estadístico según los diferentes parámetros comparables.

Representación de las posibles comparaciones mediante test estadísticos del programa *GraphPad Prism 7*. Estas comparaciones se realizarán en base a tres parámetros angulares en el proyecto como lo es la cuantificación de proteínas inflamatorias del grupo en estudio, la data pulmonar disponible y la data intrahospitalaria de los pacientes.

7. RESULTADOS

Objetivo específico 1) Analizar la data intrahospitalaria, además del nivel de secuelas pulmonares en los pacientes recuperados que cursaron COVID-19 en sus estados leve, moderado y severo.

7.1) Análisis de data intrahospitalaria.

El complejo asistencial Dr. Víctor Ríos Ruiz facilitó información clínica de 60 pacientes posterior a la aprobación y firma del consentimiento informado de quienes fueron diagnosticados con la enfermedad COVID-19 y cumplían con los criterios estipulados en el proyecto para formar parte del grupo de estudio (**Anexo-3**). 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. Desglose de la gravedad de 60 pacientes que componen el grupo de estudio.

GRAVEDAD COVID-19	Nº PACIENTES	Nº PACIENTES SARS
LEVE	18	-
MODERADO	17	10
SEVERO	25	24
TOTAL	60	34

Es así como de un total de 60 pacientes que consiguieron superar la COVID-19, 34 desarrollaron SARS y otros 26 pacientes superaron la enfermedad sin alcanzar el síndrome respiratorio. Un 67,6% de los pacientes que sufrieron SARS fueron hombres, mientras que entre los pacientes que no alcanzaron el síndrome respiratorio un 65,3% fueron mujeres, reafirmando la hipótesis que habla sobre una mayor preponderancia a desarrollar la patología de manera severa en los hombres que en las mujeres (Walls, *et al.*, 2020). Algo similar se describe en cuanto a la agresividad con la que se desarrolla la patología según la edad de cada persona, lo que se reafirma en el grupo en estudio puesto que los pacientes que desarrollaron SARS tuvieron en promedio casi 10 años más de edad que los pacientes que no presentaron SARS (**Tabla 3**).

Tabla 3. Edad promedio y sexo de los pacientes que componen el grupo en estudio.

	PACIENTES SARS (N = 34)	PACIENTES NO SARS (N = 26)
EDAD PROMEDIO (RANGO)	51 (33-76)	40.4 (20-69)*
NUMERO DE MUJERES (%)	11 (32,3%)	17 (65,3%)
NUMERO DE HOMBRES (%)	23 (67,6%)	9 (34,6%)

Valor P < 0,05 *

Ninguno de los pacientes que componen el grupo de estudio presentaba problemas respiratorios previos (**Anexo-3**), sin embargo, algunos presentaron comorbilidades al momento de ser diagnosticados con COVID-19 (**Tabla 4**). La comorbilidad más recurrente entre los pacientes fue la hipertensión (19 de 60 pacientes), manifestándose en un 41% de los pacientes que desarrolló SARS y en un 19,2% de los pacientes que no cursaron con distrés respiratorio. Además, existen otras comorbilidades previas, las cuales se presentaron mayoritariamente en el grupo de pacientes que sufrió SARS, como es la insulino resistencia, hipotiroidismo y ataques cerebrovasculares. Por otra parte, se declararon como no fumadores un 65,3% de los pacientes que no desarrolló el SARS, frente a un 58,8% de los pacientes que si presentaron SARS. Al momento del diagnóstico, mediante la PCR positiva, solo 18 de los 60 pacientes fueron asintomáticos, todos los demás presentaron algún tipo de síntoma relacionado con la infección viral (**Tabla 4**). El síntoma que más se repitió fue la cefalea, en 21 de los 42 pacientes sintomáticos, luego aparecen la disnea y la tos, en 15 y 12 de 42 pacientes respectivamente. También existe la presencia de otros síntomas como dolor torácico, polialgia, mialgia y odinofagia.

Tabla 4. Número de pacientes con comorbilidades previas a la COVID-19 y su sintomatología al momento del diagnóstico.

COMORBILIDAD	PACIENTES SARS (N = 34)	PACIENTES NO SARS (N = 26)
HIPERTENSIÓN	14	5
INSULINO RESISTENCIA	10	1
HIPOTIROIDISMO	4	1
DIABETES MELLITUS TIPO 2	4	3
ARRITMIA	0	1
ATAQUE CEREbroVASCULAR	1	0
SÍNTOMAS	-	-
CEFALEA	12	9
DOLOR TORÁCICO	3	1
ODINOFAGIA	4	1
TOS	6	6
DISNEA	10	5
POLIPNEA	2	2
MIALGIA	4	3

Al realizar una comparación de los parámetros de laboratorio entre los pacientes que presentaron SARS y los que no lo padecieron (**Tabla 5**), se determinó que en promedio los niveles de Ferritina, Proteína C reactiva (CPR), Dímero D, Fibrinógeno y conteo de glóbulos blancos (WBC) fueron mayores en el grupo de pacientes que desarrollo SARS, lo que es posible atribuir al estado inflamatorio sistémico que sufren estos pacientes y que se traduce a nivel pulmonar con la aparición del SARS. Algo similar ocurre con la relación de presión parcial de oxígeno por oxígeno inspirado fraccional ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), donde el grupo que presentó SARS tiene una $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ más baja que el grupo que no desarrolló el síndrome respiratorio, lo que habla directamente sobre los problemas respiratorios que sufre este grupo de pacientes, presentando en promedio una relación de 179.5mmHH. En cuanto a al conteo de glóbulos blancos (WBC), existe un aumento significativo de este parámetro entre los pacientes que manifiestan SARS en comparación a los pacientes que no sufrieron distrés respiratorio, lo que habla de una posible mayor infiltración de células blancas hacia el tejido pulmonar. Por otra parte, la proporción de linfocitos en este WBC, nos indica que un 7,3% del conteo de glóbulos blancos en los pacientes SARS son linfocitos, mientras que una proporción del 23,4% del WBC de los pacientes que no sufrieron SARS son linfocitos. De esta manera se identifica que en promedio los pacientes que padecen SARS en la etapa aguda de la COVID-19 padecen una linfopenia en comparación a los pacientes que no sufren distrés respiratorio.

Tabla 5. Parámetros de laboratorio de los pacientes que componen el grupo en estudio.

PARÁMETRO	PACIENTES SARS (N = 34)	PACIENTES NO SARS (N = 26)
FERRITINA (MG/DL)	2299	734 *
CPR (MG/DL)	168.9	75.5 *
WBC (X10⁹/L)	11756	5371,7 *
CONTEO LINFOCITOS (X10⁹/L)	859	1255
PROPORCION DE LINFOCITOS EN WBC (%)	7,3	23,4
DIMERO-D (MG/DL)	1629	639 *
FIBRINÓGENO (MG/DL)	713,0	511,2
RELACION PAO₂/FIO₂ (MMHG)	179,5	306,8 *

Valor P < 0,05 *

7.2) Secuelas pulmonares.

Pasados 3 a 6 meses desde el diagnóstico de la patología, entre Agosto y Noviembre de 2020, se comenzaron a reclutar nuevamente a los pacientes del grupo de estudio. Aquí, en los pacientes luego de recuperarse de la COVID-19, se realizan ciertos exámenes que evaluaron las secuelas funcionales pulmonares utilizando los test de espirometría y DLCO, además de realizar un examen que evalúa imagenológicamente las secuelas estructurales del pulmón, esto mediante TCT.

7.2.1) Análisis de tomografías computarizadas de tórax.

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 obtenidas fueron evaluadas por el médico que compone el equipo investigativo asignando un puntaje del 0 al 4 a cada uno de los 5 lóbulos pulmonares, para luego sumar cada puntaje y obtener el TSS, de esta manera a mayor TSS, mayor es la extensión del pulmón afectado. Entre los 60 pacientes recuperados de la COVID-19 un 60% presentó un TSS mayor o igual a 1 3-6 meses post infección (**Tabla 6**), lo que indica que aún persiste en

cierta medida un daño pulmonar, atribuible a una secuela de la COVID-19. De estos pacientes que presentan $TSS \geq 1$, un 55,6% padeció la patología severamente, un 33,3% manifestó la enfermedad de manera moderada y sólo un 11,1% de los pacientes que desarrolló la patología en un estado leve presentó cierta extensión del pulmón con secuelas (**Figura 10**). Por otra parte, un 40% del grupo de estudio no presentó secuelas pulmonares según las TAC, donde de entre ellos, un 58,4% padeció la patología levemente y un 20,8% correspondió a pacientes que manifestaron la COVID-19 en un nivel moderado, mismo porcentaje de pacientes que sufrieron la patología severamente (**Figura 10**).

Tabla 6. División de los pacientes según la severidad con la que padecieron la COVID-19 en su etapa activa y la presencia de un TSS mayor o igual a 1, obtenido durante la etapa de recuperación de los pacientes.

SEVERIDAD COVID-19	TSS<1	TSS≥1
LEVE	14	4
MODERADO	5	12
SEVERO	5	20
TOTAL	24	36

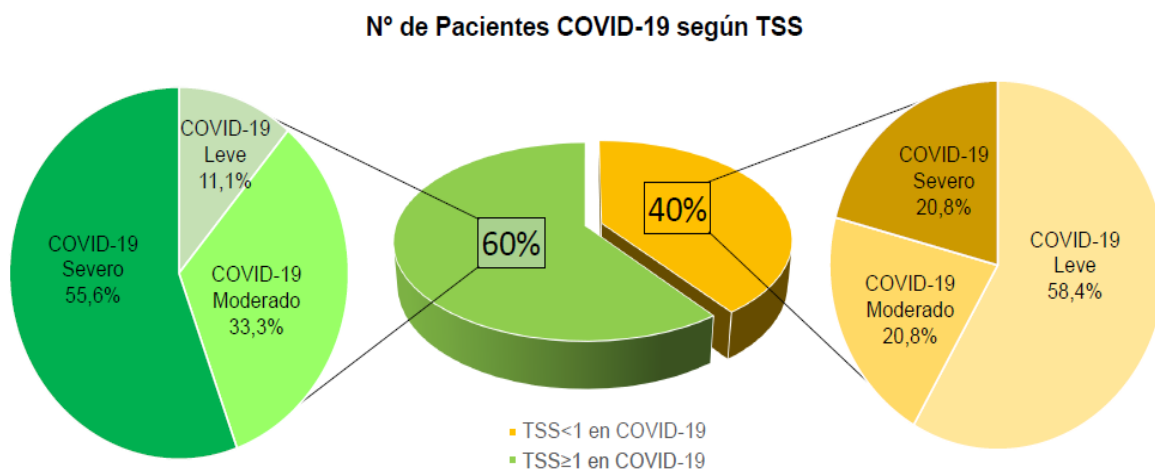


FIGURA 10. Distribución de los pacientes según su TSS correspondiente a las TAC.

Gráficos representativos de la distribución de los pacientes según la gravedad con la que padecieron la COVID-19 en la etapa aguda y sus puntajes TSS correspondientes a las TAC, donde una TAC alterada se representa con un $TSS \geq 1$ y una TAC normal se representan con $TSS < 1$.

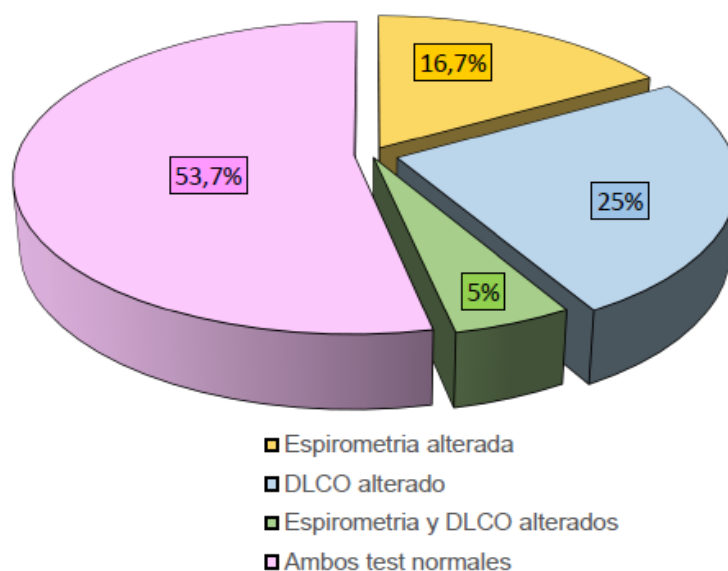
Por otra parte, se realizó un análisis estadístico con respecto al TSS obtenido por cada paciente, dividiendo al grupo en estudio según la gravedad con la que padecieron la COVID-19 (**Figura 11**). Donde fue posible determinar que existe una diferencia estadísticamente significativa sobre los TSS obtenidos por los pacientes que padecieron la patología en un nivel severo y moderado con respecto a los que padecieron la patología solo de forma leve.

7.2.2) Análisis de espirometría y DLCO.

Los test de espirometría y DLCO nos indican la funcionalidad del pulmón durante la etapa de recuperación de los pacientes, el primero evalúa la obstrucción del flujo aéreo y se determina una disminución en la funcionalidad pulmonar si su resultado es menor al 70%, mientras que, el segundo evalúa 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%.

Es así como entre los 60 pacientes del grupo en estudio un 16,7% presentó su espirometría alterada y un 25% el test DLCO alterado, mientras que sólo 3 pacientes (5%) presentaron ambos test alterados (**Figura 12-A**). De esta manera en total son 22 pacientes que presentaron al menos uno de los dos test de funcionalidad pulmonar alterado. Entre los pacientes con al menos un test alterado, se encontró que un 50% padeció la patología moderadamente, otro 41% la padeció de forma severa y solo un 9% presentó disminución de la funcionalidad pulmonar habiendo padecido la patología en un nivel leve (**Figura 12-B**).

A Pacientes con test de funcionalidad alterados



B Severidad COVID-19 y test funcionales alterados

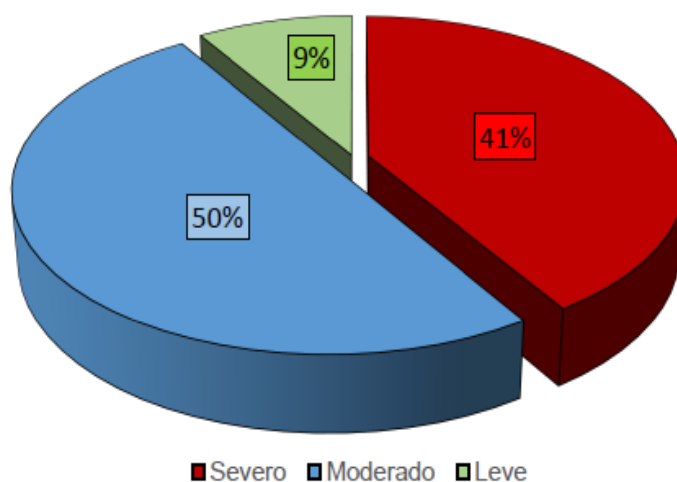


FIGURA 12. Distribución de los pacientes según los test espirometría y DLCO.

A) Distribución del grupo en estudio según sus resultados en los test de funcionalidad pulmonar. **B)** Distribución de pacientes con uno o dos test de funcionalidad alterados en función de la severidad con la que padecieron la COVID-19.

Cabe destacar que de los 60 pacientes que componen el grupo de estudio, 34 de ellos presentaron SARS, padeciendo la COVID-19 en un nivel moderado o severo (**Tabla 2**). De estos 34 pacientes que desarrollaron SARS un 88,2% presentó alguna secuela pulmonar, ya sea estructuralmente, determinada por un TSS ≥ 1 en las TCT, o funcionalmente, con un resultado menor al 70% en la espirometría o un resultado menor al 80% en DLCO.

Objetivo específico 2) Determinar los niveles de citoquinas en suero, tales como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α , además de quimioquinas, como CXCL-10, CCL-2, CXCL9 y CCL5 en personas que no padecieron la patología y en pacientes recuperados que cursaron COVID-19 en sus estados leve, moderado y severo.

7.3) Cuantificación de citoquinas.

La cuantificación de citoquinas se realizó en muestras de suero obtenidas en tres tiempos diferentes. Se cuenta sólo con 20 muestras de suero de pacientes severamente enfermos durante la etapa activa de la COVID-19. Además, se reclutaron nuevamente a los 60 pacientes del grupo de estudio para obtener muestras de suero correspondientes a la etapa de recuperación entre 3 a 6 meses posterior al diagnóstico de la patología, para posteriormente reclutar nuevamente a 55 de los 60 pacientes pero en un periodo de 12 meses posterior al diagnóstico de la COVID-19.

7.3.1) Cuantificación de citoquinas del periodo activo de la COVID-19.

La cuantificación de citoquinas tales como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , CXCL-10, CCL-2 y CXCL9 se realizó en muestras de suero obtenidas durante la

etapa activa y de recuperación de la COVID-19 de 20 pacientes que componen el grupo de estudio. Además se incluyó la cuantificación de estas citoquinas en un grupo control de 11 personas que no ha padecido la patología confirmada.

Los 20 pacientes a quienes se les cuantificaron sus niveles de citoquinas padecieron la patología de manera severa, desarrollando el síndrome respiratorio agudo severo durante la COVID-19 y además, todos presentaron algún tipo de secuela pulmonar 3 a 6 meses posterior a la etapa activa de la enfermedad, ya sea por una TCT alterada con $TSS \geq 1$, resultado en espirometría menor al 70% o un resultado de DLCO menor al 80%.

Una vez obtenidos los resultados de la cuantificación, se procedió a comparar estadísticamente los niveles de estas citoquinas, encontrando por una parte una disminución estadísticamente significativa de los niveles de citoquinas como CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 (**Figura 13**) en las muestras de los pacientes en la etapa de recuperación con respecto a los niveles de las muestras en su etapa activa. 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 tales como natural killer, monocitos y células T hacia las zonas de infección.

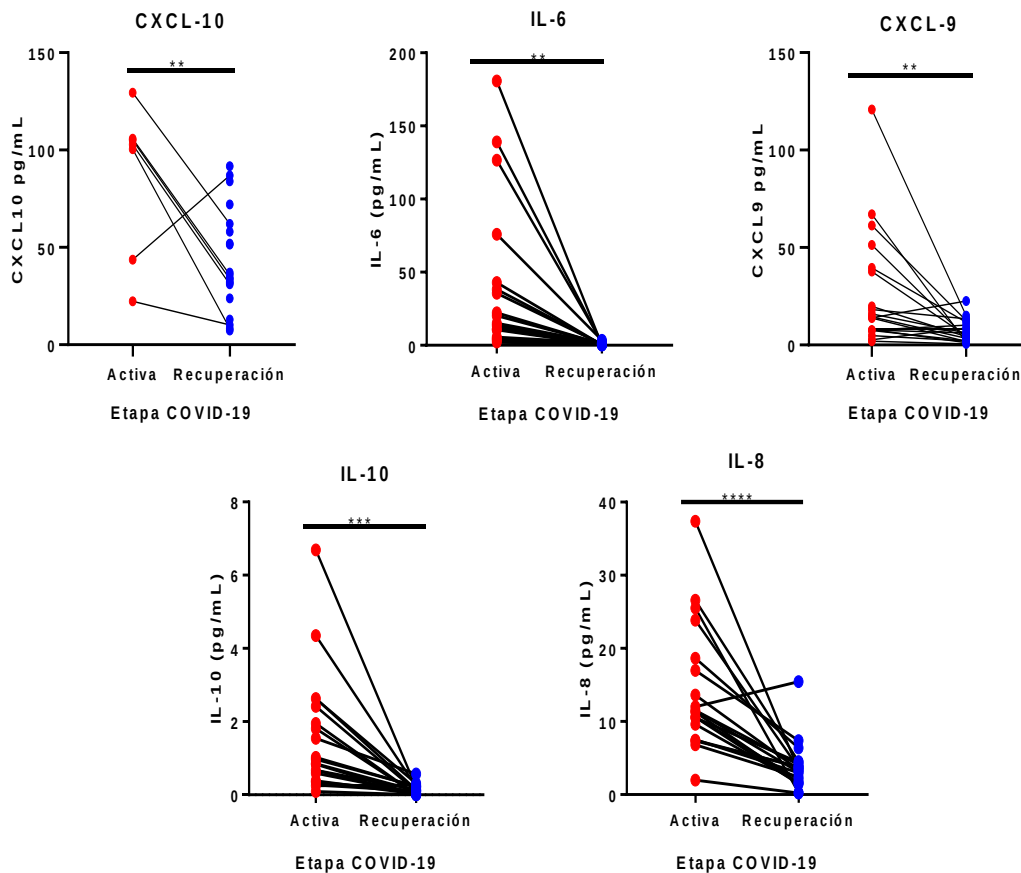


FIGURA 13. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 entre etapa activa y de recuperación.

Comparación estadística mediante T test con datos pareados entre las muestras de 20 pacientes durante la etapa activa de la patología y la etapa de recuperación (6 meses posteriores a la COVID-19). (* $p < 0,05$).

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 14**), donde no se aprecia una diferencia significativa entre los niveles de citoquinas en la etapa de recuperación con respecto a los niveles control.

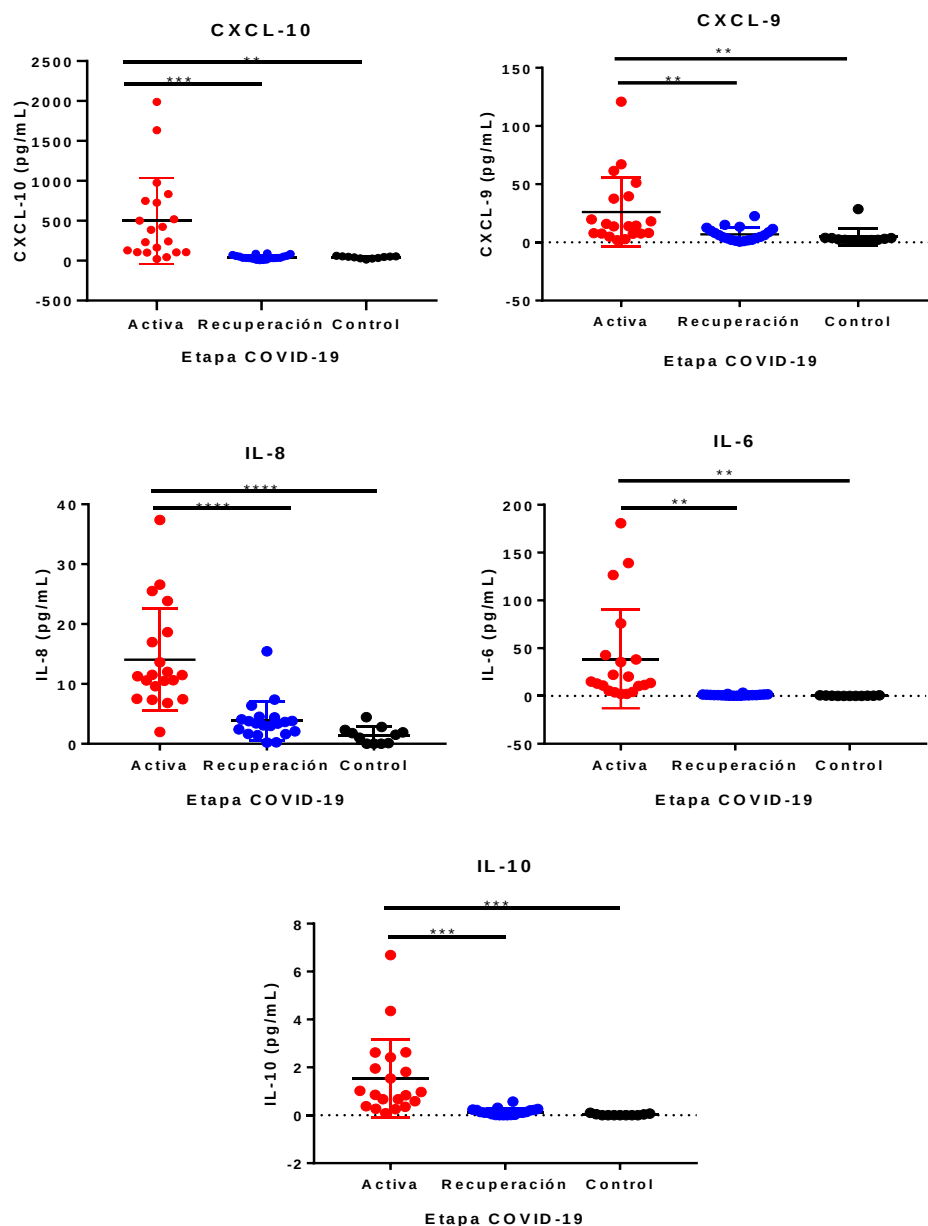


FIGURA 14. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6 e IL-10 entre la etapa activa y de recuperación.

Comparación mediante test ANOVA entre las muestras de 20 pacientes durante la etapa activa de la patología y la etapa de recuperación (6 meses posteriores a la COVID-19), además de los 11 pacientes control. (* $p < 0,05$).

Por otra parte, se determinó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de citoquinas como IL-12, TNF, IL-1 β y CCL-2 entre las muestras de suero pertenecientes a la etapa aguda y de recuperación (**Figura 15**). Estas citoquinas, pertenecientes a los 20 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.

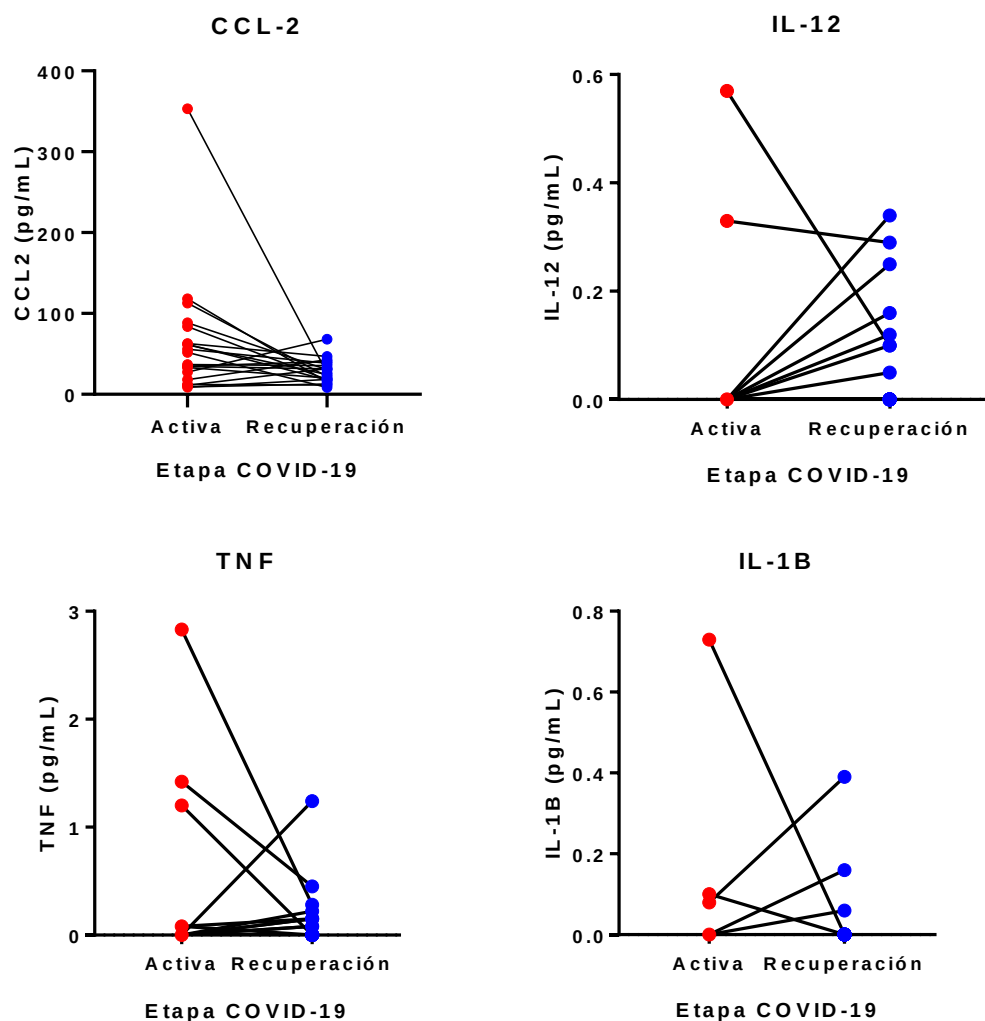


FIGURA 15. Comparación estadística de los niveles de IL-12, TNF, IL-1 β y CCL-2 entre la etapa activa y de recuperación.

Comparación estadística mediante T test con datos pareados entre las muestras de 20 pacientes durante la etapa activa de la patología y la etapa de recuperación (6 meses posteriores a la COVID-19). (* $p < 0,05$).

7.3.2) Cuantificación de citoquinas del periodo de recuperación de la COVID-19.

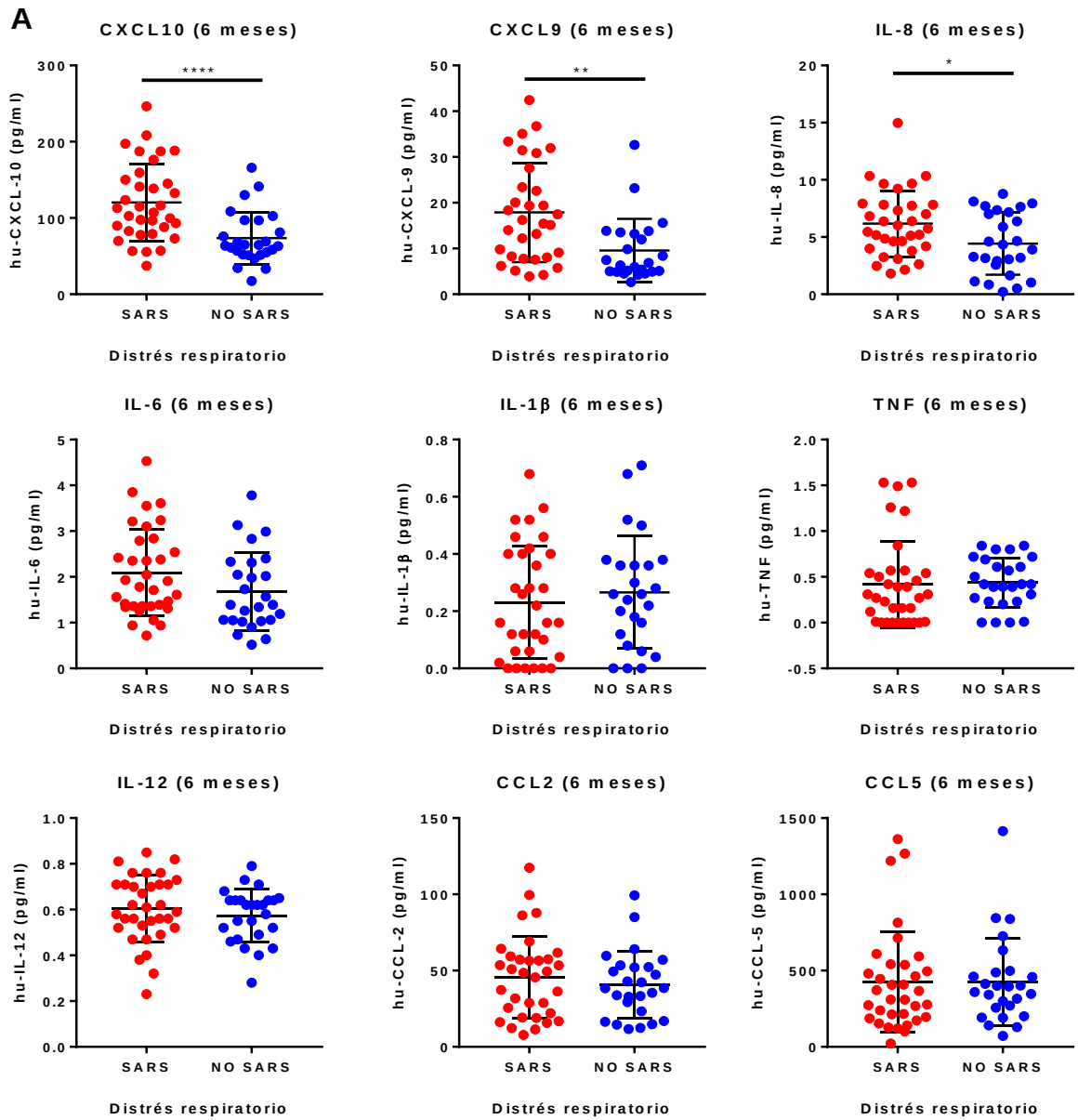
La cuantificación de las citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF, CXCL-10, CXCL-9, CCL-2 y CCL-5 se realizó en muestras de suero obtenidas a los 6 y 12 meses posteriores al diagnóstico de la COVID-19. Esta recolección de muestras sanguíneas en dos periodos de tiempos distintos se realizó reclutando a 60 pacientes 6 meses posterior al diagnóstico de la patología, para luego volver a reclutar a 55 de los 60 pacientes iniciales a los 12 meses tras el diagnóstico de la COVID-19, esta disminución de 5 personas en el reclutamiento de los 12 meses corresponden a 2 mujeres embarazadas, por lo que no cumplen con los requisitos del grupo en estudio y otros 3 individuos que desistieron de participar en esta segunda toma de muestra. Los 60 pacientes a quienes se les cuantificaron sus niveles de citoquinas padecieron la COVID-19 con distinta gravedad (severa, moderada y leve). Además se incluyó la cuantificación de estas citoquinas en un grupo control que no ha padecido la patología confirmada, siendo 12 controles sanos para la cuantificación de citoquinas a los 6 meses y 7 controles sanos para la cuantificación de citoquinas a los 12 meses posterior al diagnóstico de la patología.

Una vez obtenidos los resultados de la cuantificación, se procedió a comparar estadísticamente los niveles de estas citoquinas en los distintos tiempos de toma

de muestra, dividiendo al grupo de estudio según diferentes parámetros clínicos como: La presencia de SARS en la etapa activa de la patología, TCT, espirometría o DLCO alterados a los 6 meses posteriores al diagnóstico de la COVID-19 y finalmente si los individuos mantenían espirometría o DLCO alterados a los 12 meses posteriores al diagnóstico de la patología.

Según la comparación de la cuantificación de citoquinas tras la COVID-19 con la presencia o no de distrés respiratorio en los pacientes durante la etapa activa de la enfermedad, se encontró que existe un aumento estadísticamente significativo de los niveles de quimioquinas como CXCL-10 y CXCL-9, además de la citoquina inflamatoria IL-8 en las muestras obtenidas a los 6 meses post-COVID-19 de pacientes que si manifestaron SARS durante la etapa activa de la enfermedad en comparación a los individuos que no desarrollaron SARS (**Figura 16-A**), diferencias que se extienden al grupo control, pero que no existen entre el grupo de pacientes que no manifestó distrés respiratorio y los controles (**Figura 16-B**).

Por otra parte, en la cuantificación de citoquinas y quimioquinas a partir de muestras obtenidas 12 meses posteriores al diagnóstico de la patología, dejan de existir estas diferencias significativas entre los pacientes que presentaron SARS durante la etapa activa, quienes no manifestaron SARS y el grupo control (**Figura 17**).



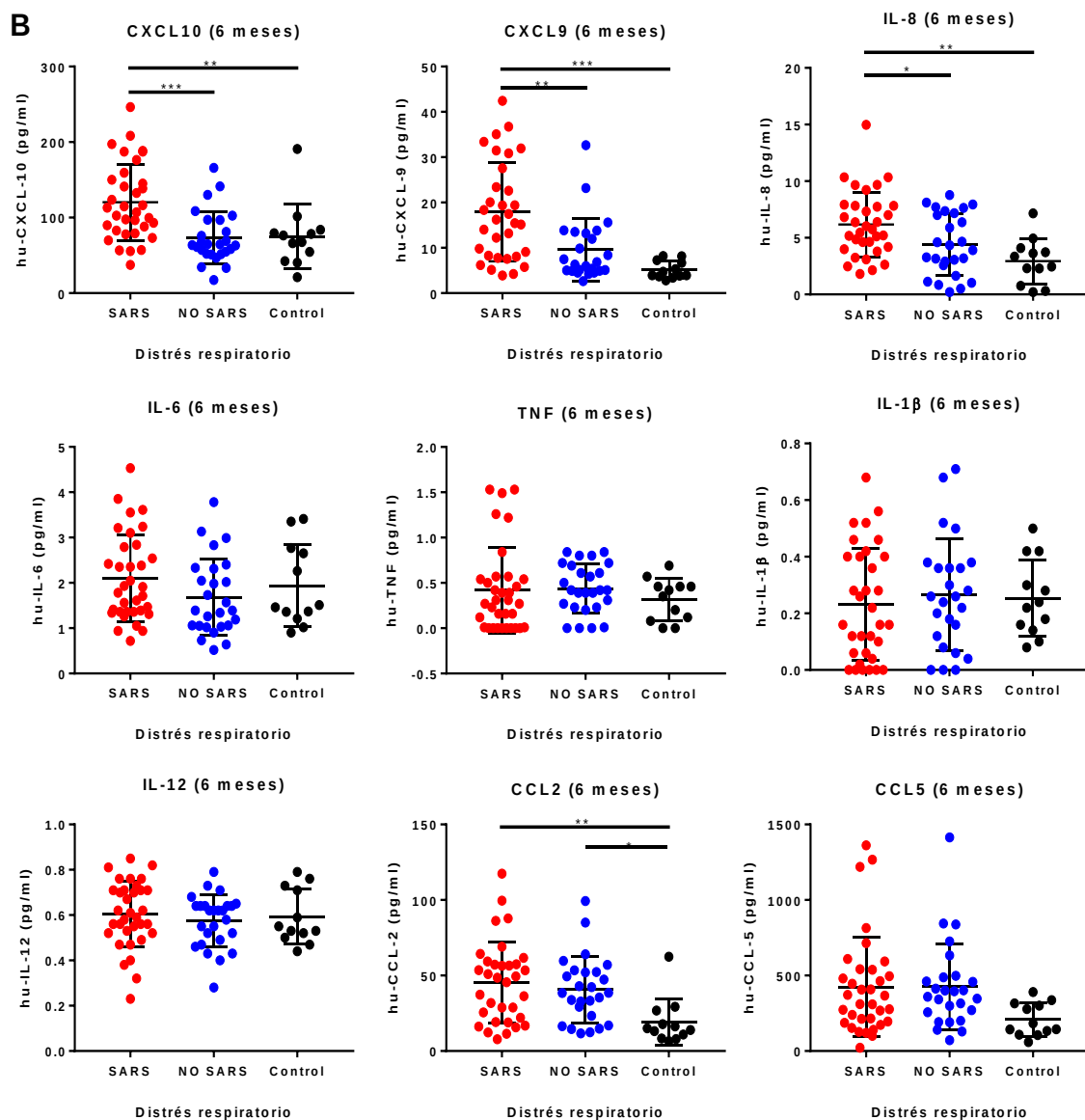


FIGURA 16. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según el desarrollo de SARS.

Comparación estadística de las distintas citoquinas obtenidas en el reclutamiento de 6 meses, dividiendo el grupo en estudio según la presencia de SARS durante la etapa activa de la COVID-19. **A)** Comparación mediante T-test con datos no pareados. **B)** Comparación mediante test ANOVA, donde se agrega un grupo control. (* $p < 0,05$)

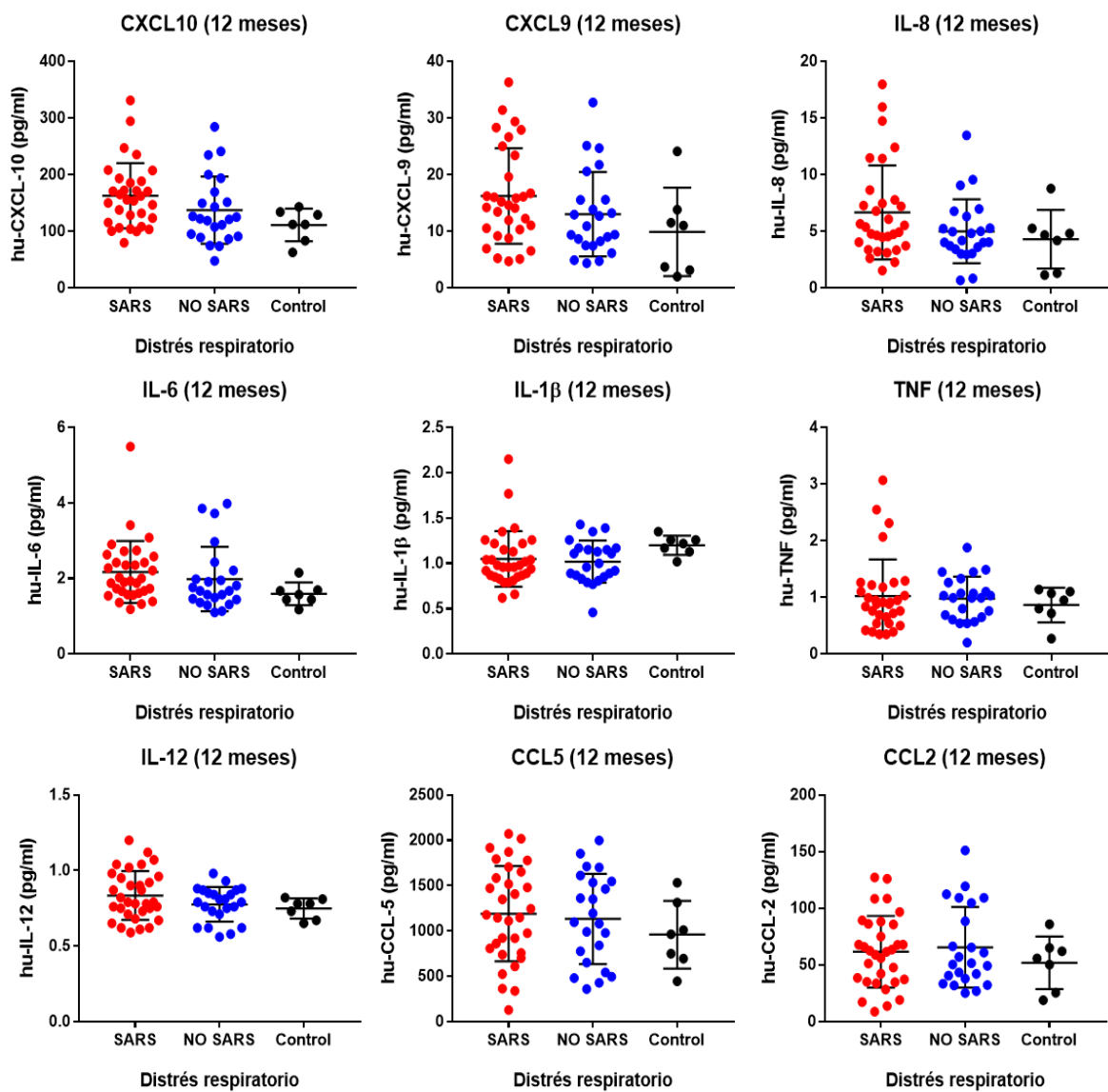


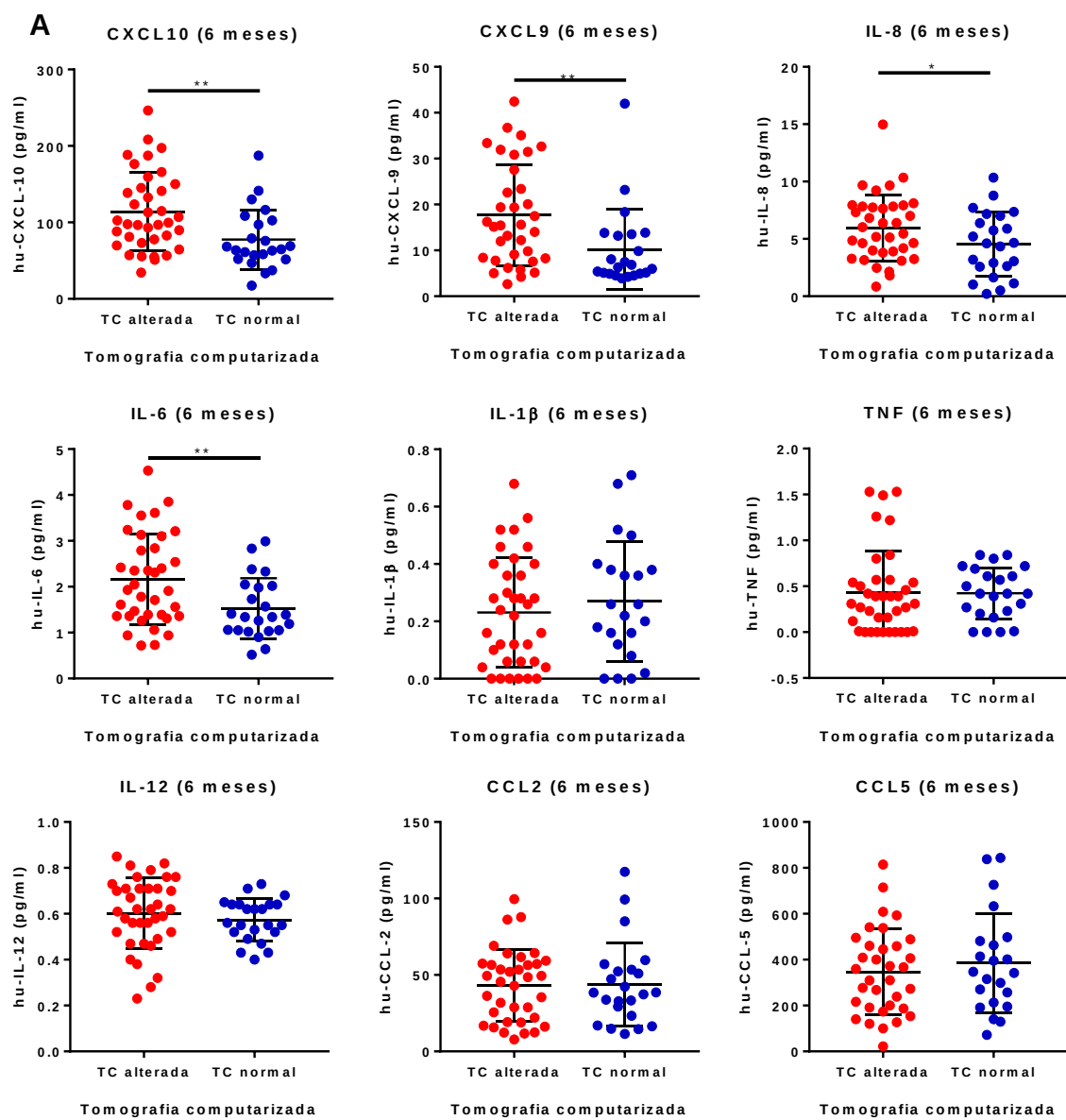
FIGURA 17. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 12 meses según el desarrollo de SARS.

Comparación estadística de las distintas citoquinas dividiendo el grupo en estudio según la presencia de SARS durante la etapa activa de la COVID-19. La comparación se realizó mediante test ANOVA de las muestras obtenidas a los 12 meses y el grupo control. (* $p < 0,05$)

Objetivo específico 3) Asociar los niveles de citoquinas cuantificadas con la data disponible y con las secuelas pulmonares en los pacientes recuperados de la enfermedad.

La siguiente comparación se realizó mediante la cuantificación de citoquinas y la presencia de secuelas estructurales a nivel pulmonar evaluadas mediante TCT obtenidas a los 6 meses superada la COVID-19. De esta manera se encontró que existen niveles significativamente más altos de las quimioquinas CXCL-10 y CXCL-9, además de las citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-8 en las muestras de suero obtenidas a los 6 meses post-COVID-19 pertenecientes a los pacientes que si presentaron una TCT alterada en comparación a los individuos que presentaron una TCT normal (**Figura 18-A**), diferencias que se extienden al grupo control, pero que no existen entre el grupo de individuos con TCT normal y el grupo control (**Figura 18-B**).

Por otra parte, en la cuantificación de citoquinas y quimioquinas a partir de muestras sanguíneas obtenidas 12 meses posteriores al diagnóstico de la patología, dejan de existir estas diferencias significativas entre los pacientes que presentaron TCT alterada a los 6 meses tras el alta médica, quienes manifestaron TCT normal y el grupo control (**Figura 19**).



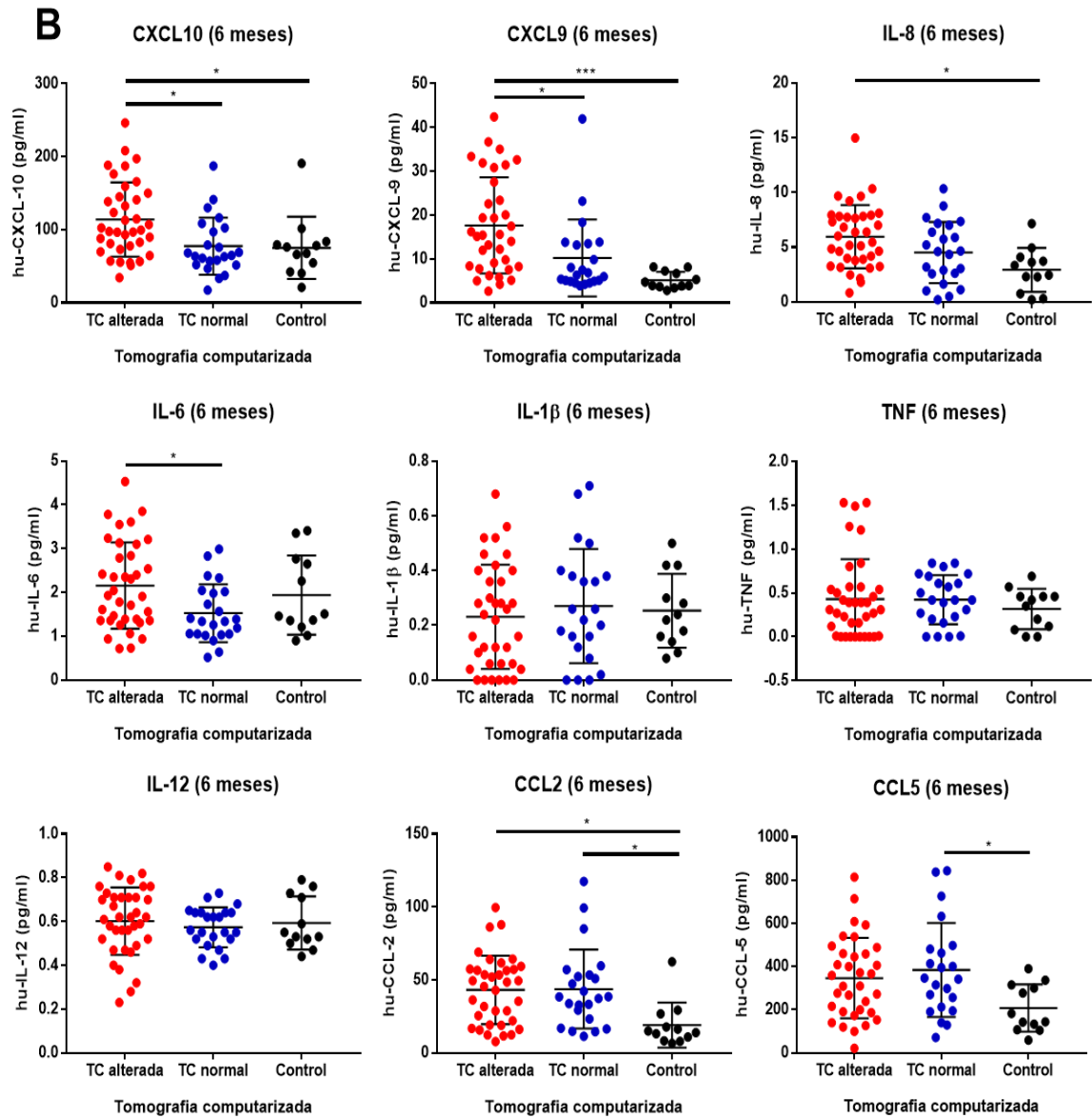


FIGURA 18. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según las TCT.

Comparación estadística de las distintas citoquinas obtenidas en el reclutamiento de 6 meses, dividiendo el grupo en estudio según las TCT obtenidas 6 meses luego de la COVID-19. **A)** Comparación mediante T-test con datos no pareados. **B)** Comparación mediante test ANOVA, donde se agrega un grupo control. (* $p < 0,05$)

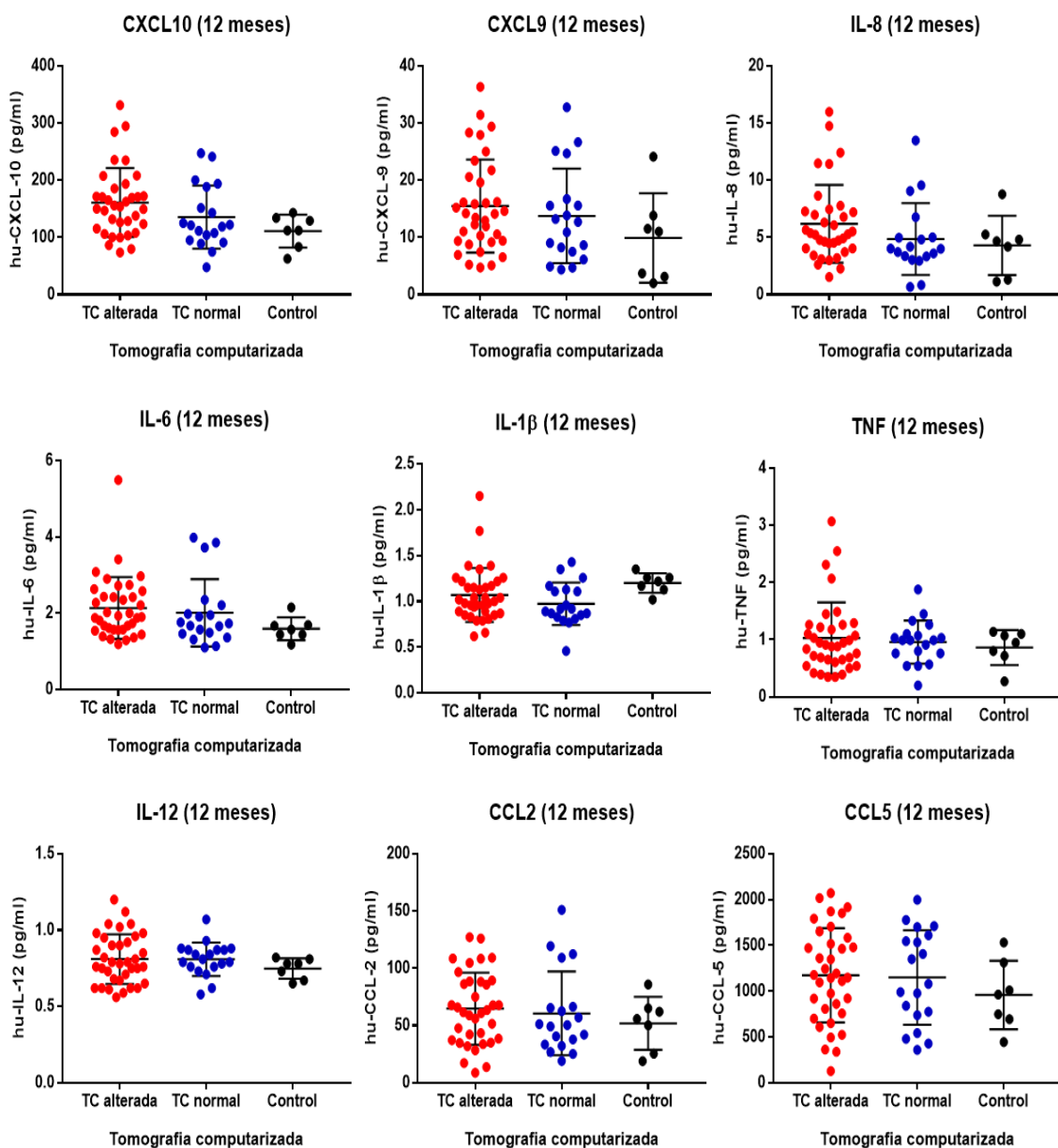
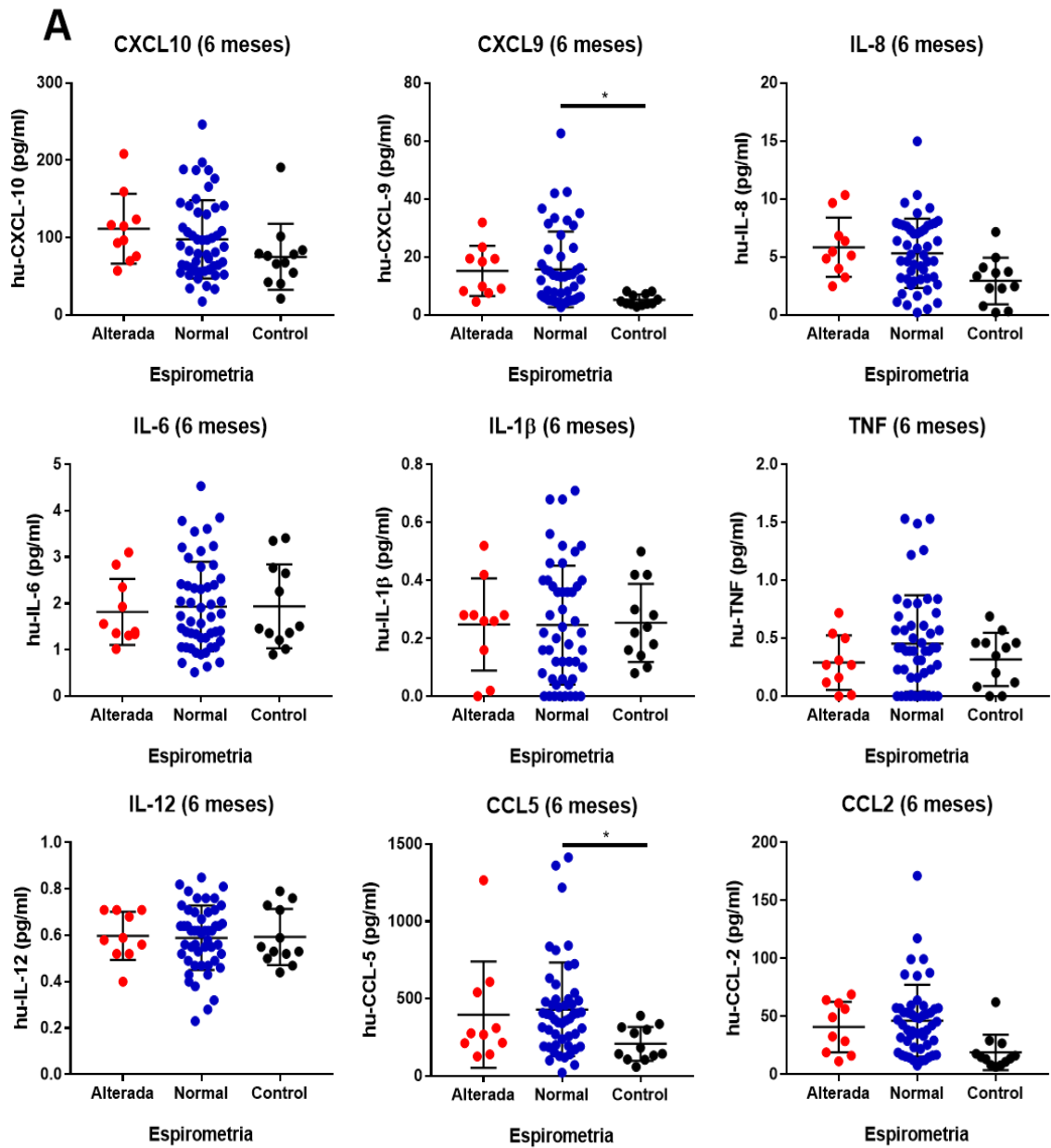


FIGURA 19. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 12 meses según las TCT.

Comparación estadística de las distintas citoquinas dividiendo el grupo en estudio según las TCT obtenidas 6 meses luego de la COVID-19. La comparación se realizó mediante test ANOVA de las muestras obtenidas a los 12 meses y el grupo control. (* $p < 0,05$)

Luego, se tomaron en cuenta como parámetros comparativos los test que evalúan la funcionalidad pulmonar, estos test fueron realizados en los pacientes en el reclutamiento de 6 meses. En primera instancia se realizó una comparación entre la cuantificación de citoquinas y la presencia de secuelas funcionales en el pulmón evaluadas mediante test de espirometría. A partir de aquello, es que se determinó que no existen diferencias considerables entre los pacientes con un test de espirometría alterado y los pacientes con un test normal con respecto a la cuantificación de citoquinas y quimioquinas obtenidas en la toma de muestras sanguíneas de 6 meses (**Figura 20-A**) y 12 meses (**Figura 20-B**) luego de la COVID-19, diferencias que tampoco existen con el grupo control.



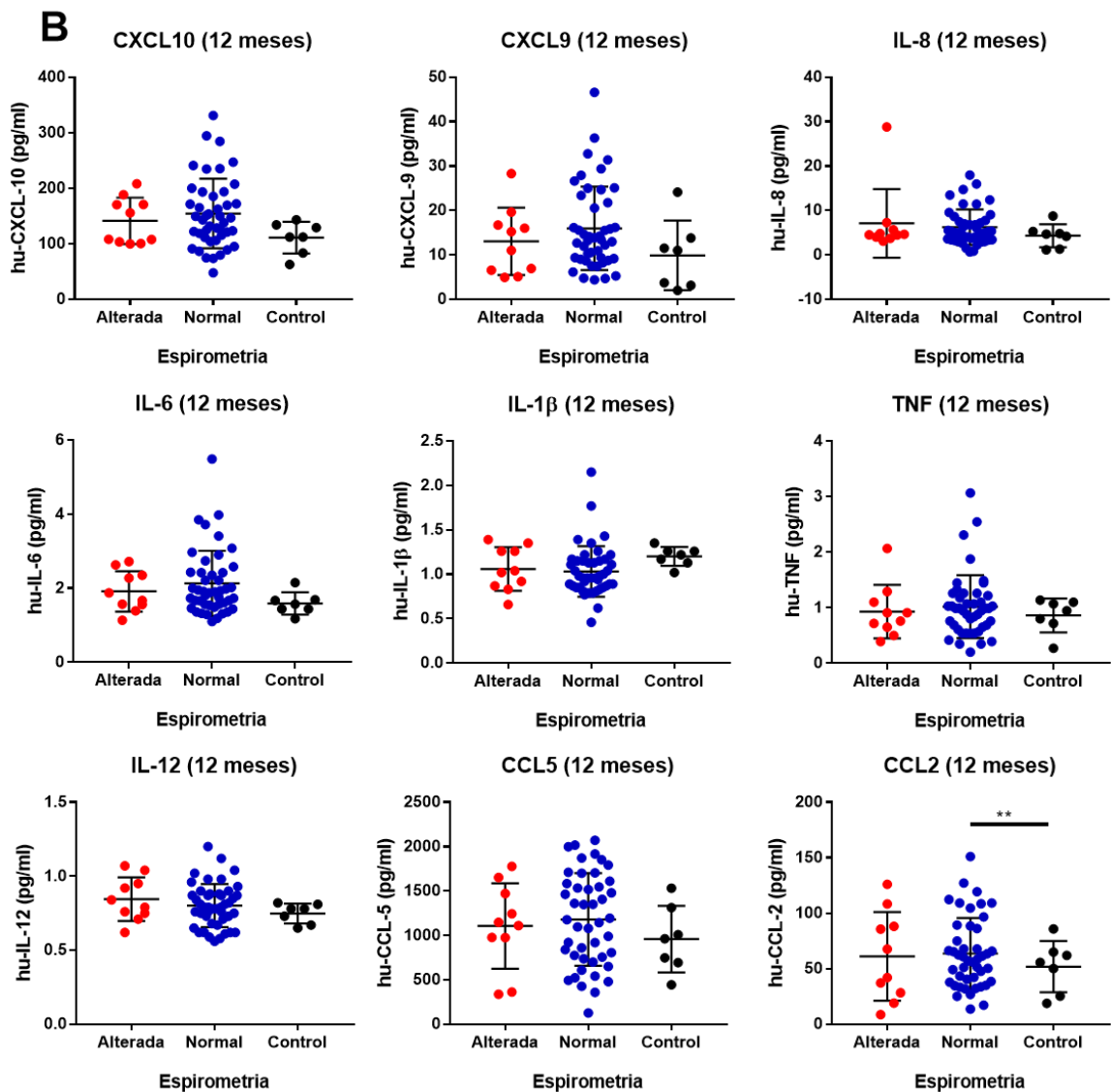
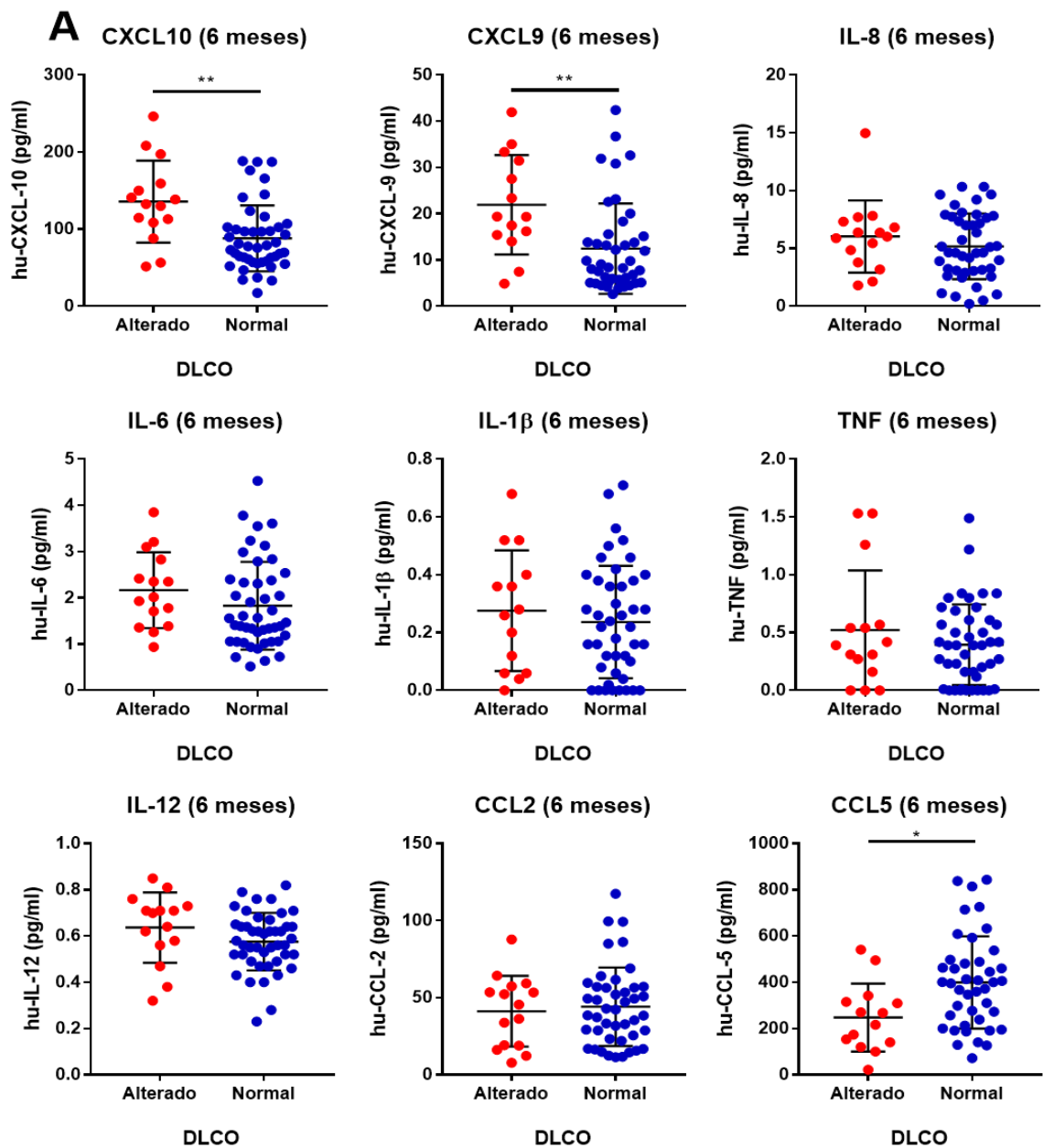


FIGURA 20. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 y 12 meses según espirometría.

Comparación estadística de las distintas citoquinas dividiendo el grupo en estudio según la presencia o no de un test de espirometría alterado, los que se realizaron 6 meses luego de la COVID-19. La comparación se realizó mediante test ANOVA. **A)** Citoquinas pertenecientes al reclutamiento de 6 meses y el grupo control. **B)** Citoquinas pertenecientes al reclutamiento de 12 meses y el grupo control. (* $p < 0,05$)

Luego, se realizó una comparación entre la cuantificación de citoquinas y la presencia de secuelas funcionales a nivel pulmonar evaluadas mediante test de DLCO. Así es como se determinó una diferencia importante entre los pacientes que presentaron un test de DLCO alterado y los individuos que presentaron un DLCO normal con respecto a los niveles de CXCL-10 y CXCL-9 pertenecientes a las muestras de 6 meses (**Figura 21-A**), diferencia que se extiende al grupo control (**Figura 21-B**). De forma particular, también existe una diferencia en la quimioquina CCL-5, la cual presenta niveles mayores en el grupo con DLCO normal frente a quienes presentaron un DLCO alterado.

Estas diferencias dejan de existir con respecto a la cuantificación de citoquinas realizadas en las muestras de los individuos 12 meses superada la COVID-19 (**Figura 22**).



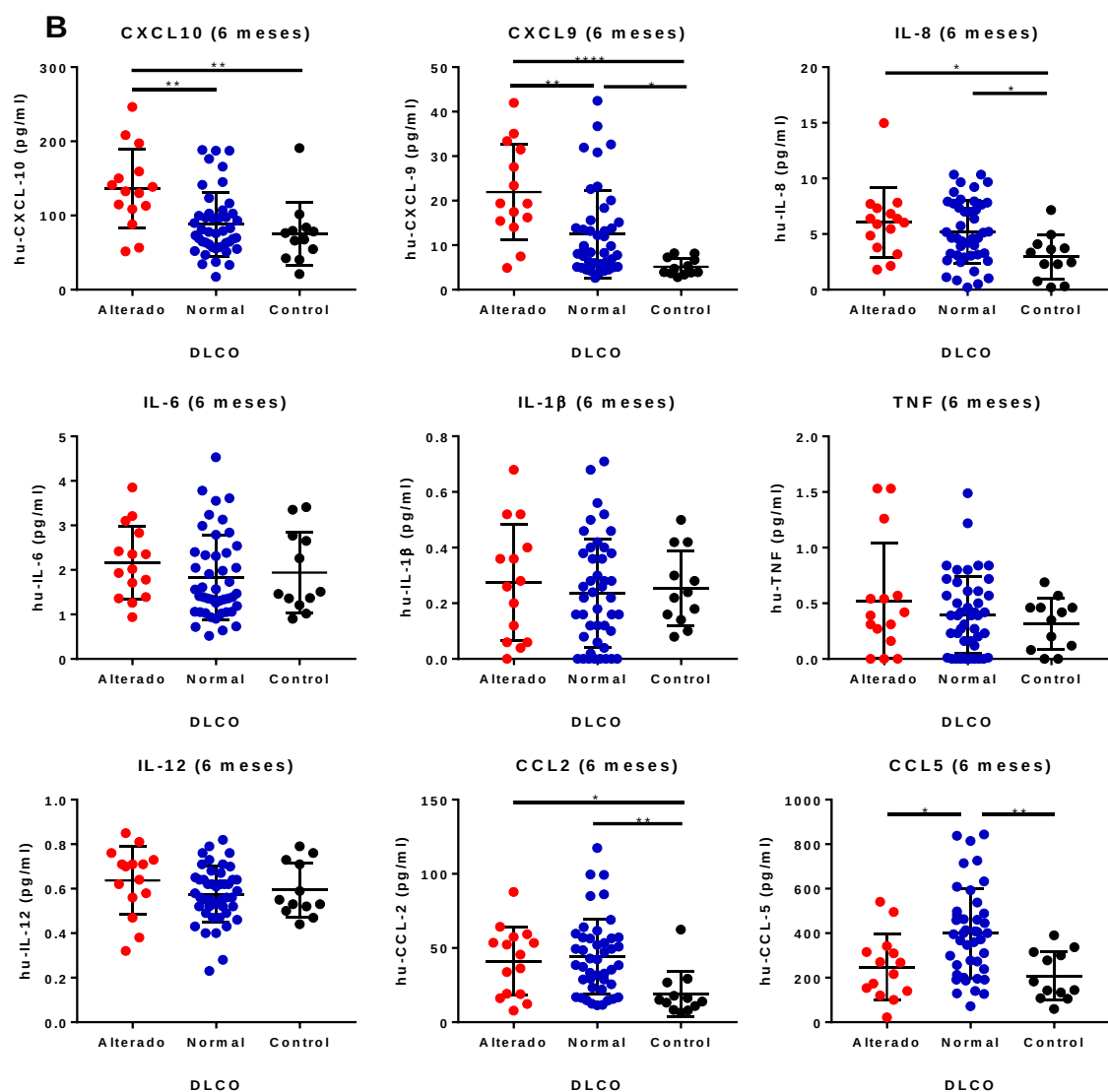


FIGURA 21. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según las TCT.

Comparación estadística de las distintas citoquinas obtenidas en el reclutamiento de 6 meses, dividiendo el grupo en estudio según el resultado de test DLCO obtenido 6 meses luego de la COVID-19. **A)** Comparación mediante T-test con datos no pareados. **B)** Comparación mediante test ANOVA, donde se agrega un grupo control. (* $p < 0,05$)

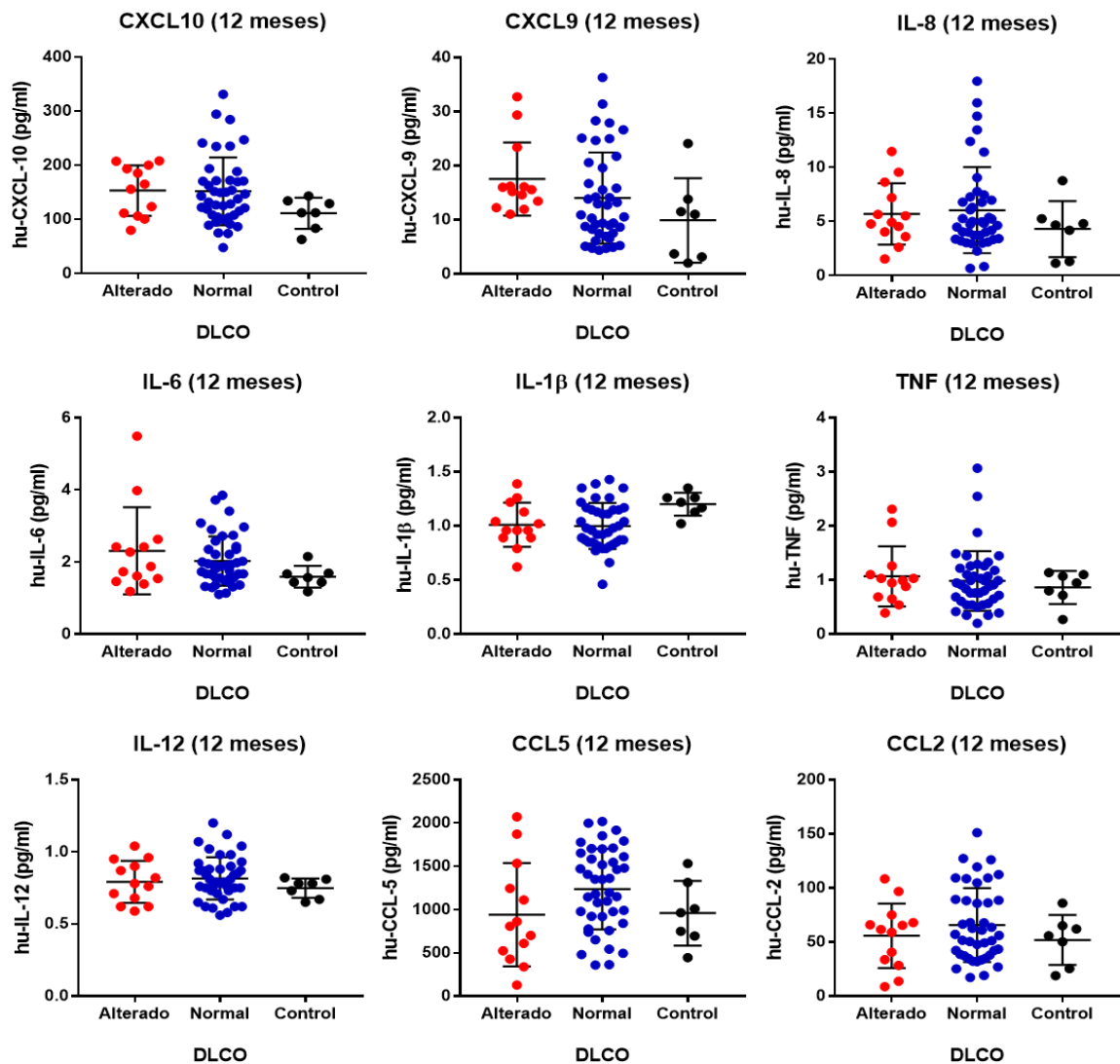
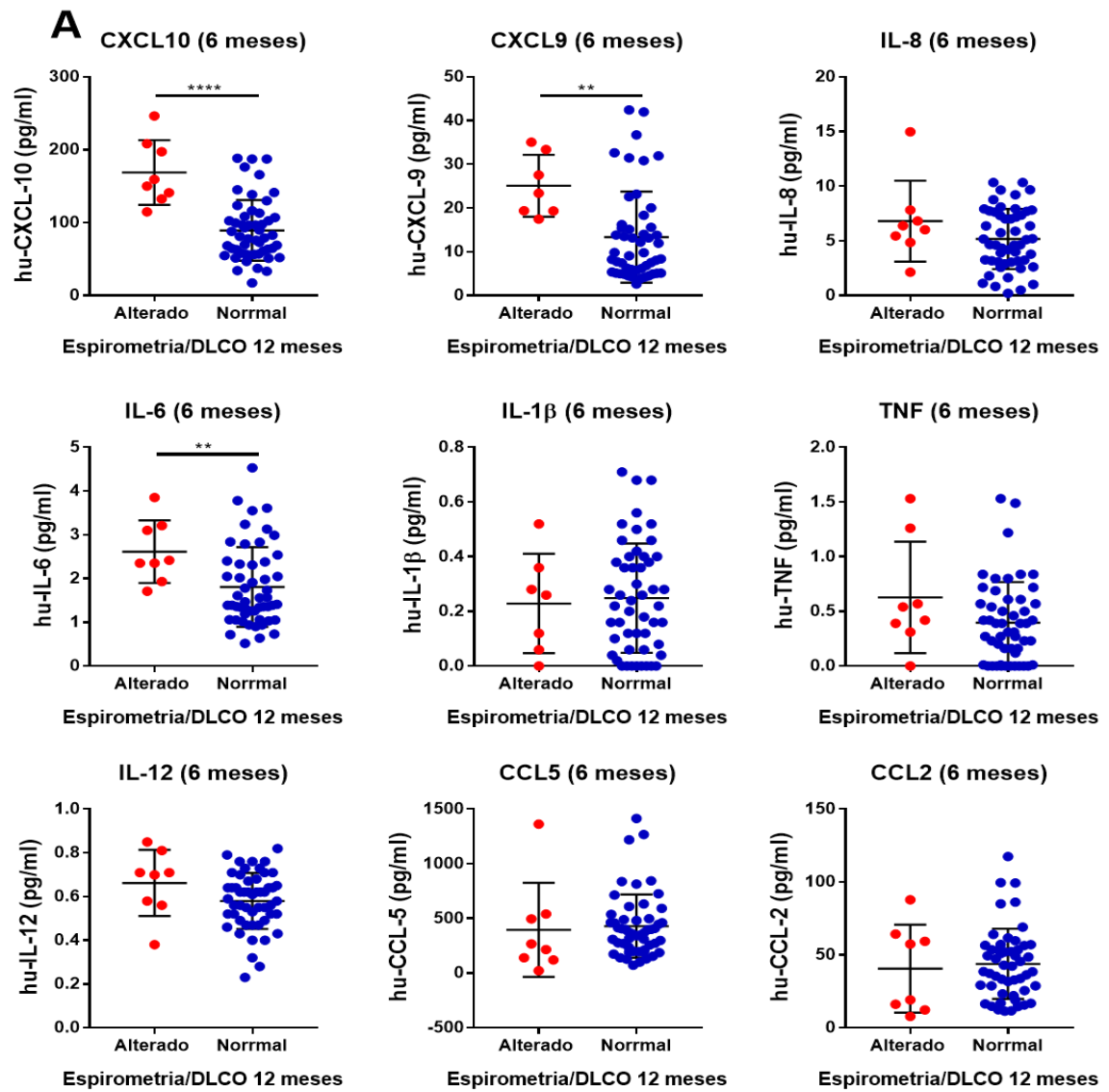


FIGURA 22. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 12 meses según test DLCO.

Comparación estadística de las distintas citoquinas dividiendo el grupo en estudio según los test DLCO obtenidos 6 meses luego de la COVID-19. La comparación se realizó mediante test ANOVA de las muestras obtenidas a los 12 meses y el grupo control. (* $p < 0,05$)

Tras observar los diferentes parámetros clínicos de los pacientes y compararlos con las cuantificaciones de las distintas citoquinas, se pudo observar que las grandes diferencias aparecen en las muestras sanguíneas obtenidas en el reclutamiento tras 6 meses de recuperación de la COVID-19. En base a esto se realizó una última comparación, para ello se tomó en cuenta a los pacientes que presentaron un test de espirometría o DLCO alterado en el reclutamiento de 6 meses y que posteriormente, en el reclutamiento de 12 meses, mantuvieron su test de espirometría o DLCO alterado. De esta forma se dividió al grupo en estudio según la presencia o no de un test de espirometría o DLCO alterado en los pacientes a los 12 meses con respecto a los niveles de citoquinas y quimioquinas pertenecientes a las muestras obtenidas a los 6 meses. Según esta división se determinó que existe un aumento significativo en las quimioquinas CXCL-10 y CXCL-9, además de la citoquina IL-6, entre los pacientes con algún test de funcionalidad pulmonar alterado a 12 meses en comparación al grupo de individuos que no presentaron alteraciones funcionales registradas por los test a los 12 meses (**Figura 23-A**), diferencias que se extienden en CXCL-10 y CXCL9, pero no en IL-6 al agregar un grupo control a la comparación (**Figura 23-B**).



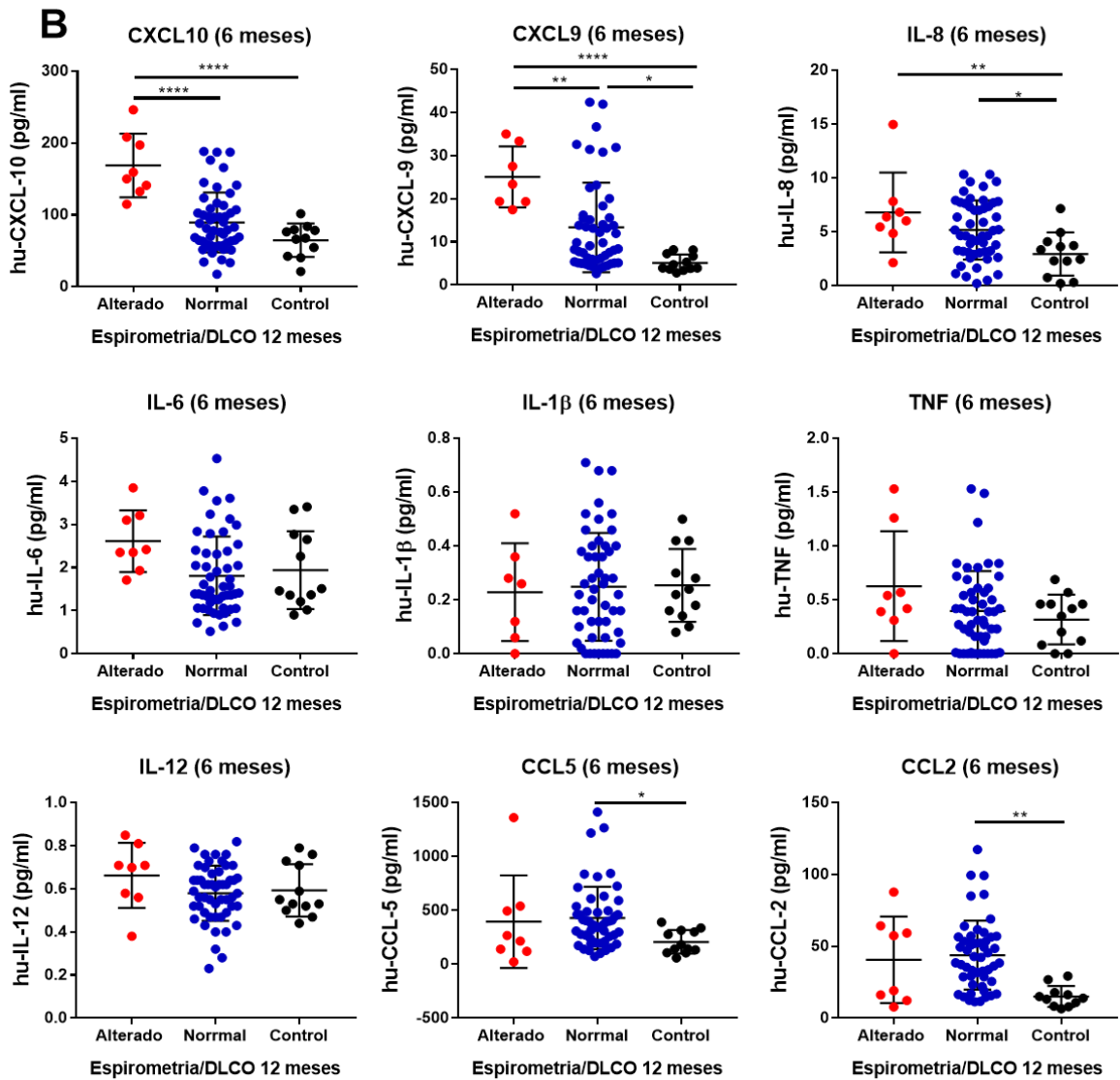
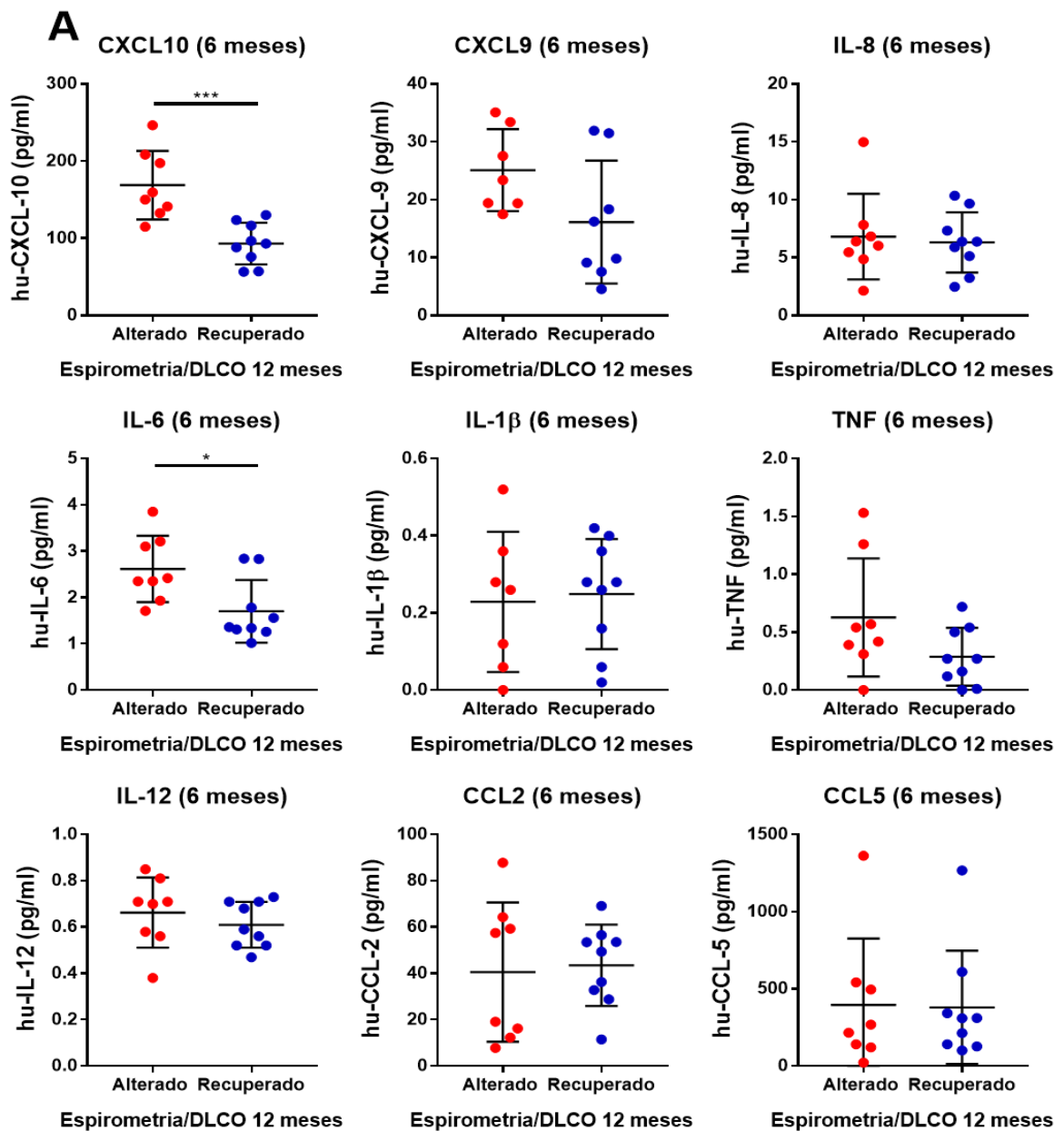


FIGURA 23. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según los test de funcionalidad pulmonar obtenidos a los 12 meses.

Comparación estadística de las distintas citoquinas obtenidas en el reclutamiento de 6 meses, dividiendo el grupo en estudio según el resultado de los test DLCO y espirometría obtenidos 12 meses luego de la COVID-19. **A)** Comparación mediante T-test con datos no pareados. **B)** Comparación mediante test ANOVA, donde se agrega un grupo control. (* $p < 0,05$)

Finalmente, puesto que el grupo de pacientes que no presentaron un test de DLCO o espirometría alterado a los 12 meses luego de la COVID-19 se compone por los pacientes que nunca presentaron un test de funcionalidad pulmonar alterado (reclutamiento de 6 y 12 meses) y por los pacientes que presentaron algún test de funcionalidad alterado en el reclutamiento de 6 meses pero que lograron recuperarse al repetir estos test a los 12 meses. Se procedió a repetir la última comparación, restando a los pacientes que jamás presentaron problemas de funcionalidad pulmonar durante su recuperación según los test realizados y se dejó solo a los pacientes que presentaron un test de DLCO o espirometría alterado a los 6 meses pero que lograron recuperarse obteniendo un resultado normal en estos test de funcionalidad a los 12 meses, a los que calificamos como pacientes recuperados. En base a esto, se determinó que se mantienen niveles más altos de CXCL-10 e IL-6 en el grupo de pacientes que mantiene un test de funcionalidad pulmonar alterado a 12 meses en comparación a los pacientes recuperados en cuanto a su funcionalidad pulmonar (**Figura 24-A**), diferencias que se extienden en CXCL-10 y CXCL9, pero no en IL-6 al agregar un grupo control a la comparación (**Figura 24-B**).



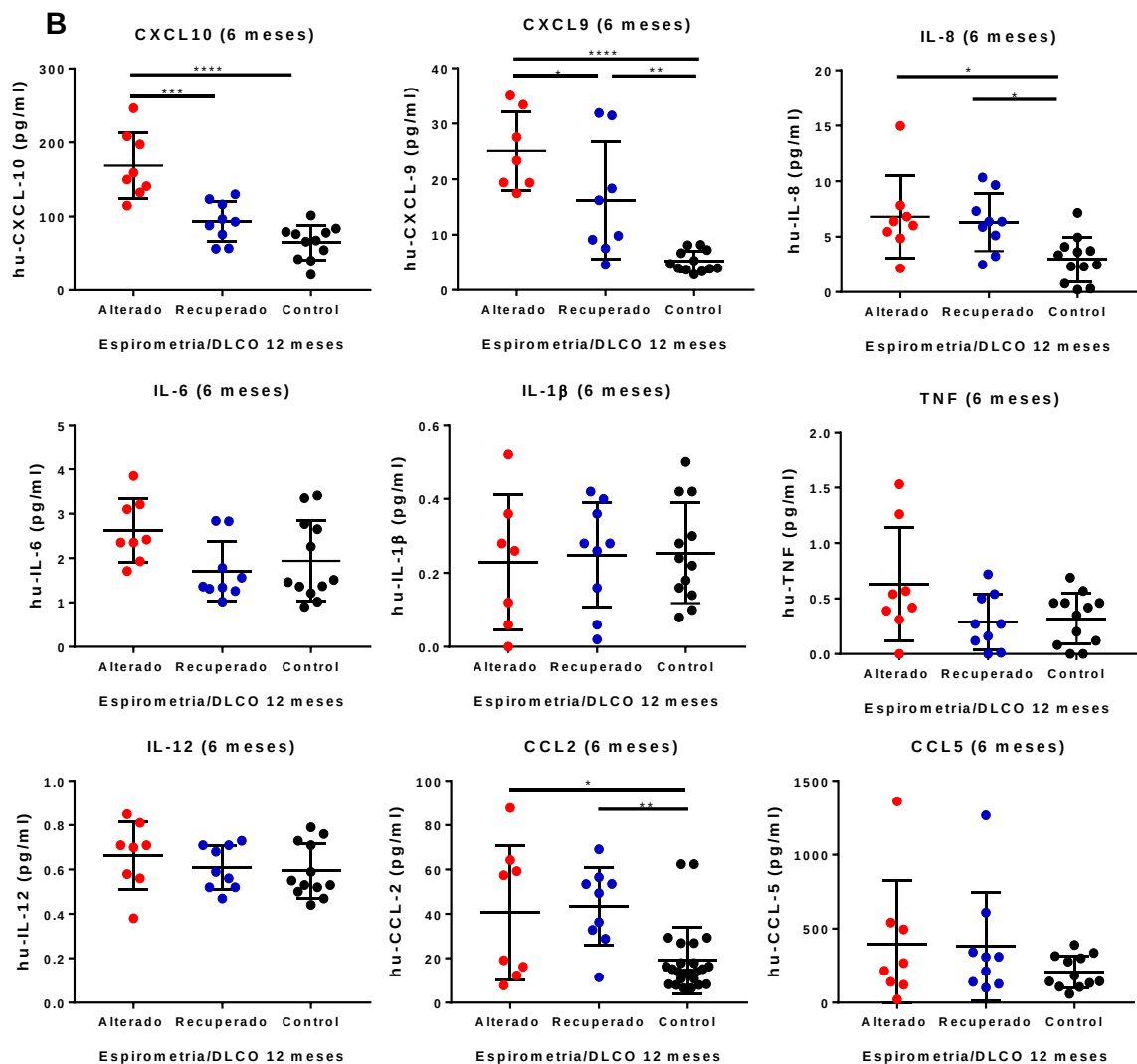


FIGURA 24. Comparación estadística de los niveles de CXCL-10, CXCL-9, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF, IL-12, CCL-2 y CCL-5 pertenecientes al reclutamiento de 6 meses según la recuperación de la funcionalidad pulmonar a los 12 meses.

Comparación estadística de las distintas citoquinas obtenidas en el reclutamiento de 6 meses, dividiendo el grupo en estudio según si lograron recuperarse de un test alterado de DLCO o espirometría a los 12 meses luego de la COVID-19. **A)** Comparación mediante T-test con datos no pareados. **B)** Comparación mediante test ANOVA, donde se agrega un grupo control. (* $p < 0,05$)

9. DISCUSIÓN

El análisis de la data intrahospitalaria de 60 pacientes chilenos que lograron recuperarse de la infección por SARS-CoV-2 permitió realizar diferentes comparaciones con el fin de comprender como se manifiesta la COVID-19 en su etapa activa. En base se observó que de los 60 pacientes que componen el estudio y que manifestaron la patología en distintos niveles de gravedad (leve, moderado y severo), 34 de ellos desarrollaron el síndrome respiratorio agudo severo, el que hasta el día de hoy sigue siendo la principal manifestación de gravedad con la que se desarrolla la patología y una de las complicaciones que más dificulta la recuperación de los individuos (Kamal, *et al.*, 2021). Además, al dividir el grupo en estudio según la presencia de SARS durante la etapa activa de la COVID-19, se observa una tendencia hacia el desarrollo de una enfermedad más agresiva cuando los individuos son de sexo masculino y de una edad superior a los 50 años. Estudios en población asiática y europeas han demostrado que si bien el género de la población no interviene en la incidencia de la infección por SARS-CoV-2, en el caso de la severidad de la infección, son los hombres quienes manifiestan una COVID-19 más agresiva, específicamente cuando son mayores de 60 años y padecen de comorbilidades (Gebhard, *et al.*, 2020). Similarmente en Chile, los indicadores sanitarios del país evidencian que los hombres fallecen a más temprana edad y se enferman con una mayor

recurrencia que las mujeres (MINSAL, 2010). Estos datos han sido atribuidos al constructo social de la masculinidad en Chile y que se traduce, entre otras cosas, con un menor cuidado de la salud personal, desencadenando el desarrollo de enfermedades crónicas (Velis, *et al.* 2018 y Courtenay W. 2000). Por otra parte, la edad de los pacientes es un factor a considerar, puesto que las comorbilidades, como hipertensión o insulino resistencia, se manifiestan por lo general en individuos sobre los 50 años, generando un deterioro progresivo y generalizado de la funcionalidad de los distintos órganos en los seres humanos, acompañado por un estado inflamatorio crónico, lo que provoca una mayor predisposición en estos pacientes a desarrollar una COVID-19 severa (Dolan, *et al.* 2020).

En cuanto a los parámetros de laboratorio de estos pacientes en la etapa activa de la COVID-19, se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de marcadores inflamatorios de los pacientes que manifestaron SARS en comparación a los que no presentaron SARS. Parámetros como proteína C reactiva y Dímero-D, nos hablan de una manifestación inflamatoria generalizada, puesto que son parámetros más bien de características inespecíficas y que pueden elevarse a causa de distintas patologías, pero aun así, ambos han sido descritos como parámetros indicativos de pronóstico de COVID-19 en los pacientes infectados (Alzoughool F., *et al.* 2021 y Valerio L., *et al.* 2021.).

Algo similar ocurre con la ferritina elevada en los pacientes SARS, esta proteína se encarga de almacenar hierro dentro de las células para posteriormente ser

utilizado con múltiples finalidades (Honarmand, *et al.*, 2012). Al igual que la proteína C reactiva y el Dímero-D, niveles elevados de ferritina han sido descritos como un parámetro que indica un pronóstico desfavorable en los pacientes infectados por SARS-CoV-2 (Velavan, *et al.*, 2021). Además, se ha señalado por diferentes investigaciones, que niveles elevados de ferritina se relacionan con una respuesta inmune disfuncional y aumento de proteínas inflamatorias, lo que es característico de una COVID-19 moderada o severa. En base a esto, también se relacionan los niveles elevados de ferritina con el síndrome de activación macrofágica. Esta inmunodesregulación ocurre cuando los macrófagos sufren una activación descontrolada, lo que media una gran liberación de citoquinas y una reducción en funcionalidad y número de linfocitos T citotóxicos, algo que ha sido ampliamente descrito entre individuos que padecen COVID-19 (McGonagle, Ramanan, *et al.*, 2021, McGonagle, Sharif, *et al.*, 2020, Otsuka, *et al.*, 2020 y Soy, *et al.*, 2020) y que de igual forma se pudo apreciar según los niveles de linfocitos que presentaban los pacientes del grupo en estudio de esta investigación, ya que, como se observa en la **Tabla 5** y según los parámetros que se indican en la guía clínica del ministerio de salud de Chile en cuanto a la interpretación de hemogramas (Retamales E. 2017), encontramos que en promedio los pacientes que padecen SARS en la etapa aguda de la COVID-19 padecen de linfopenia, algo que no ocurre entre los pacientes que no desarrollaron SARS.

Los niveles elevados de glóbulos blancos expresados según el WBC y niveles disminuidos de linfocitos entre los pacientes que presentaron SARS en comparación a quienes no padecieron de distrés respiratorio, puede ser atribuido a una respuesta inflamatoria innata exacerbada y desregulada frente a una COVID-19 de características más agresivas, con una mayor infiltración de neutrófilos y macrófagos principalmente, puesto que las células NK se encuentran con una funcionalidad reducida entre pacientes COVID-19 (Witkowski, *et al.*, 2021). Esto en su conjunto no permite un correcto paso a una inmunidad adaptativa, puesto que el ambiente inflamatorio generado puede estar dando origen a esta disminución en número y funcionalidad de linfocitos. Igualmente, es importante señalar que 24 de los 34 pacientes que desarrollaron SARS, recibieron dexametasona como tratamiento complementario para suprimir el proceso inflamatorio que conlleva una COVID-19 severa, el cual según los resultados de investigaciones clínicas, disminuye la cantidad de días que los pacientes COVID-19 severos requieren de ventilación mecánica y disminuye la incidencia de muerte entre los afectados que reciben dexametasona en dosis bajas en comparación a los pacientes COVID-19 que reciben tratamiento común sin el uso de este fármaco (Tomazini, *et al.*, 2020 y Horby, *et al.*, 2021). La dexametasona es un potente glucocorticoide sintético, utilizado como tratamiento en diferentes enfermedades que generan una respuesta inmune exacerbada puesto que es considerado un inmunomodulador no específico que inhiben la fosfolipasa-A2, lo que conlleva a una inhibición de las cascadas de señalización

que generan la liberación de proteínas inflamatorias. El tratamiento con dexametasona trae consigo efectos adversos, que también se producen en el perfil inmunológico de los pacientes COVID-19 que reciben este tratamiento, uno de esos efectos supresores colaterales es que suprimen la capacidad proliferativa e inducen un aumento de proteínas pro apoptóticas en células T, lo que conlleva a una disminución en el número de estas células a nivel periférico, manteniéndose protegidas de este efecto apoptótico las células T de médula ósea (Prenek, *et al.*, 2020, Rizk, *et al.*, 2020 y Song L., *et al.*, 2020) . Por lo que también es posible atribuir esta disminución en el conteo de linfocitos en los pacientes que desarrollaron SARS por el tratamiento complementario con glucocorticoides en algunos de los pacientes de nuestro grupo en estudio.

En cuanto a la cuantificación de citoquinas en el grupo de estudio logramos comprender, en primera instancia, como se manifiesta el perfil inmunológico con respecto a la liberación de proteínas durante la etapa activa de pacientes que manifestaron COVID-19 de forma severa. Se observó un aumento significativo de las citoquinas IL-6, IL-8 e IL-10, como también de las quimioquinas CXCL-10 y CXCL-9, cuando se comparó la cuantificación correspondiente a la etapa activa en comparación a la cuantificación, de estos mismos pacientes, 6 meses después de padecer la COVID-19, diferencias que se extienden cuando comparamos la cuantificación de proteínas de la etapa aguda con respecto al grupo control. El aumento de estas proteínas se condice con un estado híper-inflamatorio de los pacientes severamente enfermos, siendo IL-6 e IL-8 citoquinas de suma

importancia para la comunicación celular y que son liberadas principalmente por macrófagos desregulados en esta infección por SARS-CoV-2, promoviendo la síntesis de más proteínas de fase aguda y activando neutrófilos (Hoffmann et al., 2020 y Ramanan, *et al.*, 2021). Lo que se puede relacionar con los también elevados niveles de IL-10, la cual es una citoquina de carácter antiinflamatorio liberada principalmente por células T-reguladoras en el contexto del ambiente inflamatorio que predomina en los pacientes COVID-19, por lo que podría corresponder a una respuesta inmune que busca contrarrestar la descontrolada inflamación sistémica, no solo generando una señalización contraria a IL-8 o IL-6 en las distintas células, sino que también posee las características de inducir un bloqueo en la diferenciación de células Th-1 y activar la diferenciación de linfocitos B, las cuales liberan durante infecciones virales citoquinas inflamatorias e inmunoglobulinas respectivamente (Saravia, *et al.*, 2010 y Ouyang, *et al.*, 2011), lo que como vemos no logra ser suficiente según nuestros resultados de IL-6 e IL-8 y los parámetros de laboratorio de los pacientes infectados que padecen una COVID-19 de características severas. En la misma línea de lo recién mencionado aparecen CXCL-10 y CXCL-9, las cuales son quimioquinas que provocan la quimiotaxis de células inmunes como células NK, células T y macrófagos al sitio de infección, que en este contexto, es el epitelio pulmonar, por lo que estarían aumentando la infiltración de células con características pro-inflamatorias (Kuan, *et al.*, 2010 y Zang J., *et al.*, 2019).

Posteriormente se realizaron las cuantificaciones de 6 y 12 meses posteriores a la COVID-19 en todo el grupo en estudio, el cual se compone por pacientes que cursaron la patología de forma leve, moderada y severa. A partir de estas cuantificaciones se realizaron múltiples comparaciones dividiendo al grupo en estudio según diferentes características, la primera clasificación corresponde a si los individuos padecieron SARS durante la etapa aguda de la COVID-19, determinando que según la cuantificación de citoquinas de 6 meses, existe una diferencia significativa en cuanto a la concentración de las proteínas IL-8, CXCL-9 y CXCL-10, las cuales se encontraban en mayor número entre los pacientes que padecieron SARS durante la etapa activa en comparación a los pacientes que no terminaron por desarrollar SARS. Estos resultados entregan indicios sobre que los pacientes que sufren de una COVID-19 de forma moderada/severa acompañada por SARS, manifiestan 6 meses después una elevación de proteínas de características inflamatorias en comparación a los que desarrollaron una COVID-19 de menor grado, proteínas que además se repiten con respecto a la cuantificación en muestras que pertenecían a la etapa activa de la patología. En base a estos resultados y a lo descrito por otras investigaciones, se pueden relacionar IL-6, IL-8, CXCL-9 y CXCL-10 con la severidad de la COVID-19 (Song, *et al.*, 2020 y Liu, *et al.*, 2020).

Luego, al dividir el grupo en estudio con respecto a sus secuelas estructurales del pulmón gracias a la evaluación realizada en ellos a los 6 meses post-COVID-19 mediante TCT, encontramos que los pacientes que manifiestan una TCT

alterada presentan una elevación significativa de IL-6, IL-8, CXCL-9 y CXCL-10 con respecto a la cuantificación de proteínas de 6 meses frente al grupo de pacientes que no manifestaron una TCT alterada. De esta manera se puede mencionar que existe una clara relación, dada la elevación de proteínas IL-6, IL-8, CXCL-9 y CXCL-10, entre la gravedad con la que se manifiesta la COVID-19, el desarrollo de SARS y la extensión del pulmón que permanece afectado 6 meses después de superar la patología.

Por último, al dividir el grupo en estudio según los resultados de los test de espirometría y DLCO, los cuales nos entregaron una mirada sobre la funcionalidad pulmonar de los pacientes 6 meses después de superar la patología, se determinó que no existieron diferencias significativas en la cuantificación de proteínas de 6 meses con respecto a los individuos que presentaban un test normal o alterado de espirometría. Algo diferente ocurrió cuando se dividió al grupo en estudio según si presentaron o no un test de DLCO alterado, determinando que los pacientes que presentaron problemas en la difusión de monóxido de carbono pulmonar presentaban un aumento significativo de las quimioquinas CXCL-9 y CXCL-10 en comparación a los pacientes con un test de DLCO normal. Esta diferencia en la cuantificación de proteínas con respecto a ambos test se puede relacionar con que si bien estos exámenes evalúan la funcionalidad pulmonar, poseen parámetros diferentes para determinar esta funcionalidad pulmonar. Por una parte, el test de espirometría prueba la capacidad mecánica pulmonar en cuanto a la inspiración y expiración

de los individuos, mientras que el test DLCO estima la capacidad de difusión del monóxido de carbono a través de la barrera alveolo capilar, por lo que estima precisamente la funcionalidad de la barrera alveolo capilar (Benítez, *et al.*, 2020 y Caviedes, *et al.*, 2014). Es así, como se vuelve importante continuar desarrollando investigaciones relacionadas con el mecanismo molecular por el cual CXCL-9 y CXCL-10 se relacionan con una disfuncionalidad en cuanto a la difusión de monóxido de carbono pulmonar, mecanismo que probablemente no afecte la función mecánica del pulmón evaluada por espirometría.

En base a estos resultados se buscó determinar una asociación entre la cuantificación de citoquinas y las secuelas funcionales del pulmón a largo plazo, para ello, el grupo en estudio se dividió según si presentaban un test de funcionalidad pulmonar alterado a los 6 meses y que posteriormente a los 12 meses post-COVID-19 seguían manteniendo un test de funcionalidad alterado. Estos pacientes con secuelas funcionales a los 12 meses post-COVID-19 presentaron un aumento significativo en cuanto a la cuantificación de proteínas de 6 meses en la citoquina IL-6 y en las quimioquinas CXCL-9 y CXCL-10 en comparación con los pacientes que evidenciaron un test funcional alterado a los 6 meses pero que lograron superar esta disfuncionalidad a los 12 meses. Es así, como se relacionan las proteínas IL-6, CXCL-9 y CXCL-10 con un daño funcional a nivel pulmonar a largo plazo. Estas proteínas de carácter inflamatorio, no se encuentran elevadas de manera exacerbada en el reclutamiento de muestras de 6 meses en comparación a como si encontraban en la cuantificación realizada en

las muestras de fase aguda, pero por algún motivo siguen altas en comparación al grupo control y los pacientes que recuperan la funcionalidad pulmonar, ejerciendo su efecto inflamatorio, ya sea como comunicador celular de la respuesta inmune innata por parte de IL-6 o como quimioatrayente de células inmunes pro-inflamatorias por parte de CXCL-9 y CXCL-10, las que por mecanismos aún desconocidos provocan una disfunción respiratoria en los pacientes que lograron superar la COVID-19 pero que la manifestaron de manera agresiva.

Además, como se pudo apreciar según los resultados de la cuantificación de proteínas en muestras recolectadas 12 meses superada la patología, no se aprecian diferencias significativas en ninguna citoquina al dividir el grupo en estudio por los distintos parámetros antes mencionados (presencia de SARS en etapa activa o exámenes de secuelas pulmonares alterados), ni tampoco existieron grandes diferencias entre los pacientes recuperados de la COVID-19 y el grupo control, por lo que se deduce que las citoquinas y quimioquinas vuelven a rangos normales 12 meses superada la COVID-19.

10. CONCLUSIÓN

Gracias al análisis de los datos intrahospitalarios y los posteriores exámenes realizados a los pacientes 6 y 12 meses tras superar la COVID-19, se vuelve relevante precisar que existe una clara predisposición a desarrollar, tras superar la patología, secuelas pulmonares de carácter estructural o funcional entre los pacientes que desarrollan una COVID-19 agresiva durante la etapa activa. Además, según la cuantificación de citoquinas y quimioquinas, se identificaron las proteínas IL-6, IL-8, CXCL-9 y CXCL-10, todas de características inflamatorias, como marcadores que se relacionan con la severidad con la que se manifiesta la COVID-19, mientras que según los distintos exámenes con respecto a las secuelas pulmonares se pudo observar que IL-6, CXCL-9 y CXCL-10 son proteínas que se relacionan con problemas en la funcionalidad respiratoria de pacientes 12 meses tras superar la COVID-19. Es así como se torna de suma relevancia determinar el mecanismo por el cual estas distintas proteínas inflamatorias inducen un daño en el funcionamiento pulmonar, lo que conlleva un deterioro en el diario vivir de los pacientes tras superar la COVID-19.

11. GLOSARIO

COVID-19: Enfermedad producida tras la infección por el nuevo coronavirus, afectando de distintas maneras y gravedad en función de cada persona.

Neumonía: La infección de un virus o una bacteria provoca esta afección, la cual se basa en la inflamación de los sacos de aire de uno o ambos pulmones, los que pueden llenarse de fluido.

SARS: Siglas que corresponden al Síndrome Respiratorio Agudo Severo el cual es una forma grave de neumonía. En esta investigación también se menciona como distrés respiratorio.

SARS-CoV-2: Siglas que corresponden al nombre del nuevo virus, Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2. El SARS-CoV-2, es el agente patógeno que provoca la COVID-19.

Tormenta de citoquinas: Reacción inmunitaria grave por la que el cuerpo libera muy rápido demasiadas citoquinas en la sangre y la que es característica de la COVID-19.

UCI: Siglas que corresponden a la Unidad de Cuidados Intensivos. Esta unidad es donde se mantienen los pacientes graves, que en el contexto de la COVID-19, manifiestan un distrés respiratorio severo y necesitan vigilancia constante.

Zoonosis: Son enfermedades infecciosas transmisibles desde animales vertebrados al ser humano bajo condiciones naturales. Esta es la vía por la que se sospecha comenzó la infección por SARS-CoV-2 en los humanos.

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Alzoughool, F., Alanagreh, L., Abumweis, S., & Atoum, M. (2021). Cerebrovascular comorbidity, high blood levels of C-reactive protein and D-dimer are associated with disease outcomes in COVID-19 patients. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 77(3), 311–322. <https://doi.org/10.3233/CH-201002>
- 2) 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>
- 3) Benítez L. *et al.* (2016). Espirometría: recomendaciones y procedimiento. *Neumol. Cir. Torax.* Vol. 75 - Núm. 2:173-190. <http://www.scielo.org.mx/pdf/nct/v75n2/0028-3746-nct-75-02-00173.pdf>
- 4) Cáceres, Becerra, *et al.* (2020). Initial CT scanning in patients with COVID-19 pneumonia in the peruvian central air force hospital: a case series. *AMP.* 37(3):330-5. doi: <https://doi.org/10.35663/amp.2020.373.1010>
- 5) Caviedes, Borzone, Briceño, *et al.*, (2014). Estandarización de la prueba de capacidad de difusión de monóxido de carbono. *Rev. Chil. Enf. Respir.* 30: 145-155
- 6) Chen, J., Wu, L., Zhang, J. *et al.* (2020). Deep learning-based model for detecting 2019 novel coronavirus pneumonia on high-resolution computed tomography. *Sci Rep.* 10, 19196 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76282-0>

- 7) Chen Y, Diao B, Wang C, Chen X, Liu Y, Ning L, Chen L, Li M, Liu Y, Wang G, Yuan Z, Feng Z and Wu Y(2020) Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* 11:827. doi:10.3389/fimmu.2020.00827

- 8) Corman, V. M., Muth, D., Niemeyer, D., & Drosten, C. (2018). Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 163–188. doi:10.1016/bs.aivir.2018.01.001

- 9) 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>

- 10) Courtenay, W. (2000). Constructions of masculinity and their influence on men's wellbeing: a theory of gender and health. *Soc. Sci. Med.* 50.

- 11) Dayarathna, S., Jeewandara, C., Gomes, L. *et al.* Similarities and differences between the 'cytokine storms' in acute dengue and COVID-19. *Sci Rep.* 10, 19839 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76836-2>

- 12) Dolan, M.E., Hill, D.P., Mukherjee, G. *et al.* (2020). Investigation of COVID-19 comorbidities reveals genes and pathways coincident with the SARS-CoV-2 viral disease. *Sci Rep* 10, 20848. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77632-8>

- 13) Francone, M., Iafrate, F., Masci, G.M. *et al.* (2020). Chest CT score in COVID-19 patients: correlation with disease severity and short-term prognosis. *Eur Radiol.* 30, 6808–6817 <https://doi.org/10.1007/s00330-020-07033-y>

- 14) Gebhard, C., Regitz-Zagrosek, V., Neuhauser, H. K., Morgan, R., & Klein, S. L. (2020). Impact of sex and gender on COVID-19 outcomes in Europe. *Biol. Sex Differ.* 11(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00304-9>
- 15) Hasichaolu, *et al.* (2020). Circulating Cytokines and Lymphocyte Subsets in Patients Who Have Recovered from COVID-19. *Biomed Res. Int.* 7570981.
- 16) Hoffmann, M., *et al.* (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.e8.
- 17) Honarmand Ebrahimi, K., Bill, E., Hagedoorn, PL. *et al.* (2012). The catalytic center of ferritin regulates iron storage via Fe(II)-Fe(III) displacement. *Nat Chem Biol.* 8, 941–948 <https://doi.org/10.1038/nchembio.1071>
- 18) Hong, K.S., Ahn, J.H., Jang, J.G. *et al.* GSK-LSD1, an LSD1 inhibitor, quashes SARS-CoV-2-triggered cytokine release syndrome in-vitro. *Sig Transduct Target Ther.* 5, 267 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00391-5>
- 19) Horby, P., Lim, W. S., Emberson, J. R., *et al.* (2021). Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. *NEJM.* 384(8), 693–704. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA2021436>
- 20) Hu, B., Guo, H., Zhou, P. *et al.* (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 19, 141–154 <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

21) Jain, A., Chaurasia, R., Sengar, N.S. *et al.* (2020). Analysis of vitamin D level among asymptomatic and critically ill COVID-19 patients and its correlation with inflammatory markers. *Sci Rep.* 10, 20191 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77093-z>

22) Kamal, M., Abo Omirah, M., Hussein, A., & Saeed, H. (2021). Assessment and characterisation of post-COVID-19 manifestations. *Int. J. Clin. Pract.* 75(3), e13746. <https://doi.org/10.1111/ijcp.13746>

23) 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>

24) Letko, M., *et al.* (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5(4), 562–569.

25) 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>

26) Liang, B., Xie, L., Yang, F. *et al.* CT changes of severe coronavirus disease 2019 based on prognosis. *Sci Rep.* 10, 21849 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78965-0>

27) Liu Q. Q., *et al.* (2020). Cytokines and their relationship with the severity and prognosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a retrospective cohort study. *BMJ Open.* 10:e041471.

28) Lu, R., Zhao, X., Li, J., *et al.* (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)

29) McGonagle, D., Sharif, K., O'Regan, A., & Bridgewood, C. (2020). The Role of Cytokines including Interleukin-6 in COVID-19 induced Pneumonia and Macrophage Activation Syndrome-Like Disease. *Autoimmun. Rev.* 19(6), 102537. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102537>

30) McGonagle, D., Ramanan, A.V. & Bridgewood, C. (2021). Immune cartography of macrophage activation syndrome in the COVID-19 era. *Nat Rev Rheumatol*. 17, 145–157. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00571-1>

31) Merad, M., Martin, J.C. *et al.* (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol*. 20, 355–362 <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0331-4>

32) Ministerio de salud de Chile (MINSAL). (2010). Implementación del enfoque de riesgo en el programa de salud cardiovascular. Departamento enfermedades no transmisibles. <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/787e4765248bc9e0e04001011f0172b5.pdf>

33) Otsuka, R., & Seino, K. I. (2020). Macrophage activation syndrome and COVID-19. *Inflamm. Regen.* 40, 19. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00131-w>

34) Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>

- 35) 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>
- 36) Prenek, L., Litvai, T., *et al.* (2020). Regulatory T cells are less sensitive to glucocorticoid hormone induced apoptosis than CD4+ T cells. *Apoptosis: int. j. program. cell death*. 25(9-10), 715–729. <https://doi.org/10.1007/s10495-020-01629-x>
- 37) Ramírez, Arboleda y McCollough. (2008). Tomografía computarizada por rayos X: Fundamentos y actualidad. *Rev. ing. biomed.* vol.2 no.4.
- 38) Retamales E. (2017). Recomendaciones para la interpretación de hemogramas: serie blanca, roja y plaquetaria, Instituto de salud pública de Chile. Versión 2. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. 18pp.
- 39) Rizk, J. G., Kalantar-Zadeh, K., *et al.* (2020). Pharmaco-Immunomodulatory Therapy in COVID-19. *Drugs*. 80(13), 1267–1292. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01367-z>
- 40) Sánchez-Oro *et al.* (2020). Radiological findings for diagnosis of SARS-CoV-2 pneumonia (COVID-19). *Med Clin*. S0025-7753(20)30185-8.
- 41) 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>

42) Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>

43) Song, CY., *et al.* (2020). Immune dysfunction following COVID-19, especially in severe patients. *Sci Rep.* 10, 15838.

44) Song, L., Cao, L., Liu, R., *et al.* (2020). The critical role of T cells in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Cell death & disease.* 12(1), 45. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03249-4>

45) Soy, M., Keser, G., Atagündüz, P., Tabak, F., Atagündüz, I., & Kayhan, S. (2020). Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. *Clin. Rheumatol.* 39(7), 2085–2094. <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05190-5>

46) Tian, W., Zhang, N., Jin, R. *et al.* (2020). Immune suppression in the early stage of COVID-19 disease. *Nat Commun.* 11, 5859 <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19706-9>

47) Tomazini, B. M., Maia, I. S., Cavalcanti, A. B., *et al.* (2020). Effect of Dexamethasone on Days Alive and Ventilator-Free in Patients With Moderate or Severe Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19: The CoDEX Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 324(13), 1307–1316. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.17021>

48) Valerio, L., Ferrazzi, P., Sacco, *et al.* (2021). Course of D-Dimer and C-Reactive Protein Levels in Survivors and Nonsurvivors with COVID-19 Pneumonia: A Retrospective Analysis of 577 Patients. *Thromb. Haemost.* 121(1), 98–101. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1721317>

49) Velavan, T.P., Kuk, S., Linh, L.T.K. et al. (2021). Longitudinal monitoring of laboratory markers characterizes hospitalized and ambulatory COVID-19 patients. *Sci Rep.* 11, 14471. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93950-x>

50) Véliz, A y Bianchetti, A. (2018). Enfoque de Género en la atención de salud de pacientes con enfermedades cardiovasculares en Chile. *Rev Chil Cardiol.* vol.37 no.2. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-85602018000200143>

51) Walls, A. C., et al. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 181(2), 281–292.e6.

52) Wang, P., Luo, R., Zhang, M. et al. (2020). A cross-talk between epithelium and endothelium mediates human alveolar–capillary injury during SARS-CoV-2 infection. *Cell Death Dis.* 11, 1042 <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03252-9>

53) Wilk, A.J., et al. (2020). A single-cell atlas of the peripheral immune response in patients with severe COVID-19. *Nat Med.* 26, 1070–1076.

54) Witkowski, M., Tizian, C., Ferreira-Gomes, M. et al. (2021). Untimely TGFβ responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04142-6>

55) Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., et al. (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>

56) Wu Z, McGoogan JM. (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*. 2020;323(13):1239–1242. doi:10.1001/jama.2020.2648

57) Xu, X., *et al.* (2020). Effective treatment of severe COVID-19 patients with tocilizumab. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117(20), 10970–10975.

58) Yang, Y., Shen, C., Li, J., *et al.* (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.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.027>.

59) 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>

60) 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>

61) Zeqing Feng, Bo Diao, Rongshuai Wang, Gang Wang, *et al.* (2020). The Novel Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Directly Decimates Human Spleens and Lymph Nodes. *Med Rxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.27.20045427>

62) Zhang, D., Guo, R., Lei, L., Liu, H., *et al.* (2020). COVID-19 infection induces readily detectable morphologic and inflammation-related phenotypic changes in peripheral blood monocytes. *J. Leukoc. Biol.* doi:10.1002/jlb.4hi0720-470r

63) Zhang, N., Xu, X., Zhou, L. Y., Chen, G., Li, Y., Yin, H., & Sun, Z. (2020). Clinical characteristics and chest CT imaging features of critically ill COVID-19 patients. *Eur J Radiol.* 30(11), 6151–6160. <https://doi.org/10.1007/s00330-020-06955-x>

64) Zhao, Y., Sui, L., Wu, P. *et al.* (2021). A dual-role of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein in regulating innate immune response. *Sig Transduct Target Ther.* 6, 331. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00742-w>

13. ANEXO-1

Consentimiento del Comité Ético Científico del Servicio Salud Biobío.



N° 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 Ético 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 8°, 10°, 14° y 15° de la Ley N° 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.Q. 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 humores 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.

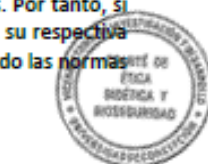
Para el estudio, observacional de carácter básico-traslacional, se requiere la obtención de datos clínicos y por esto se realizará la toma de muestra de sangre de los participantes, las que se utilizarán para hemograma, inmunofenotipo y ensayos funcionales, y la fracción de suero, para medir anticuerpos 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
ESPÍRITU



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, confiriendo 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, secrevrid@udec.cl
Concepción, Chile



100 AÑOS
DE
DESARROLLO
LIBRE DEL
ESPÍRITU

14. ANEXO-2

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).

15. ANEXO-3

Características del grupo de estudio.

Se incluyeron 60 pacientes con edad ≥ 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.