



Casa abierta al tiempo



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD XOCHIMILCO**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

**REPORTE DEL SERVICIO SOCIAL**

**Marcadores genéticos asociados al desarrollo de la infección por SARS-CoV-2**

**ASESOR INTERNO:** M. en C. Leticia Ortega Almanza

**ASESOR EXTERNO:** Dra. Mónica Escamilla Tilch

**ALUMNO:** Corona Monroy Mariana

**MATRICULA:** 2172029660

**LUGAR DE REALIZACIÓN:**

Centro Médico Nacional 20 de noviembre

**FECHA DE INICIO:**

07/11/2022

**FECHA DE CONCLUSIÓN:**

07/06/2023

## INDÍCE

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>5</b>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>12</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>13</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>18</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>20</b>
<b>Conclusión .....</b>	<b>21</b>
<b>Bibliográfica .....</b>	<b>23</b>

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunogénica y Nutrición, que se encuentra dentro del área del Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE bajo la dirección de la Dra. Mónica Escamilla Tilch y en colaboración con la Mtra. Leticia Ortega Almanza de Sistemas Biológicos en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Este proyecto se encuentra registrado ante los comités de investigación, ética en investigación y Bioseguridad del C.M.N. “20 de noviembre”- ISSSTE con el no. 460.2021 y financiado bajo el PP-E015 para Ciencia y Tecnología ISSSTE

## **1. Abreviaturas**

ARDS: Síndrome de dificultad respiratoria aguda

CMN: Centro Médico Nacional.

CoV: Coronavirus

gDNA: DNA genómico.

HCoV-OC43: Coronavirus humano OC43

IC: Intervalo de confianza.

Ig: Inmunoglobulinas.

IL-1RA: antagonista del receptor de IL-1.

IL: Interleucina

MERS-CoV: Síndrome Respiratorio de Oriente Medio

mRNA: ARN mensajero, del inglés messenger RNA.

NKs: células asesinas naturales, del inglés Natural Killers.

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: odds ratio.

PCR-SSP: Reacción en cadena polimerasa con cebadores específicos de secuencia, del inglés Sequence-Specific Primers.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, del inglés Polymerase Chain Reaction.

SARS: Síndrome Respiratorio Agudo Grave

SNPs: polimorfismos de nucleótido simple, del inglés single nucleotide polymorphisms.

Th1 y Th2: linfocitos T cooperadores tipo 1 y 2, del inglés T-helper cell type 1 ó type 2.

TNF: tumor de necrosis tumoral, del inglés tumor necrosis factor.

## 2. Introducción

Los coronavirus (CoV) son virus de RNA que pertenecen a la familia *Coronaviridae*, tiene una forma esférica con un tamaño entre 120 a 160 nanómetros con envoltura, contiene un genoma no segmentado de RNA monocatenario de polaridad positiva (27 a 32 kb), poliadenilados en el extremo 3 y la nucleocápside helicoidal tiene un diámetro de 9 a 11 nanómetros. Las proteínas del coronavirus son las responsables de la gravedad con la que un individuo desarrolla la enfermedad, estas están comprendidas por la nucleocápside (N) fosforilada de 50 a 60 kDa, una glucoproteína de membrana (M) de 20 a 35 kDa que sirve de proteína de matriz embebida en la doble capa de lípido de la envoltura y que interacciona con la nucleocápside, y la glucoproteína de espiga (S; 180 a 220 kDa) que constituye los peplómeros de forma de “corona” (Riza, 2020).

Existen cuatro clases de coronavirus, alfa, beta gama y delta, todos atacan el sistema respiratorio bajo y generan neumonía, sin embargo, SARS-CoV-2 perteneciente a la clase beta tiene una mayor tasa de contagio causando afección multisistémica (Su, 2016; Tang, 2020).

La infección por SARS-CoV-2 se ha clasificado en tres etapas dependiendo del grado de severidad, la primer etapa es la inicial (incubación), la segunda es el periodo sintomático no severo y la tercera etapa es la grave, para desarrollar una respuesta inmune protectora en las etapas de incubación y no severa, el hospedero debe contar con buena salud y un fondo genético que contribuya a la inmunidad antiviral específica (Huang et al., 2020), al ser una enfermedad multifactorial el fondo genético juega un papel crucial ya que posee influencia en la regulación de la respuesta inmune, así como la frecuencia de marcadores los cuales son un segmento de ADN que se encuentra en un lugar determinado en un cromosoma conocido y está altamente asociada a la etnicidad (Guan W-J et., al 2020).

Aunado a lo anterior aproximadamente el 99.9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos, es decir, sus diferencias fenotípicas y susceptibilidades a ciertas enfermedades, radica en el 0.1% de variación; a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de ADN. En algunos casos las enfermedades genéticas pueden ser causadas

por estos polimorfismos y también son utilizados como marcadores de ciertas enfermedades, al ser causal de riesgo para el desarrollo o progresión de esta. Los polimorfismos localizados cerca de un “gen candidato” pueden ser usados para hallar el gen por sí mismo a través de un mapeo genético (Bobadilla, 2016).

La identificación de dichos marcadores permitirá ayudar a la comprensión de los mecanismos implicados en el virus SARS-CoV-2, y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Es por eso que la respuesta inflamatoria juega un rol fundamental, una de las principales citocinas que tiene un papel mediador determinante en el inicio, progresión y riesgo asociado a esta enfermedad es el factor de necrosis tumoral (TNF), es una proteína de 17 kDa de señalización celular (citoquina) involucrada en la inflamación sistémica que conforman la reacción de fase aguda, consta de 157 aminoácidos, es un homotrímero en solución y su bioactividad está regulada principalmente por los receptores de unión al *TNF- $\alpha$*  solubles, en los humanos, el gen se mapea en el cromosoma 6. El TNF es producido principalmente por macrófagos activados, linfocitos T y células asesinas naturales (NK) (Atzeni 2020).

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Coronavirus**

Los coronavirus (CoV) pertenecen a la familia Coronaviridae género Coronavirus, virus de RNA esférico con un tamaño aproximado de 120 a 160 nm con envoltura, contiene un genoma no segmentado de RNA monocatenario de polaridad positiva (27 a 32 kb), poliadenilados en el extremo 3 y la nucleocápside helicoidal tiene un diámetro de 9 a 11 nanómetros. En la superficie externa de la envoltura hay proyecciones ampliamente espaciadas de forma de pétalo de 20 nm de longitud, sugestivas a una “corona solar”. Las proteínas estructurales del virus están comprendidas por la proteína de la nucleocápside (N) fosforilada de 50 a 60 kDa, una glucoproteína de membrana (M) de 20 a 35 kDa que sirve de proteína de matriz embebida en la doble capa de lípido de la envoltura y que interacciona con la nucleocápside, y la glucoproteína de espiga (S; 180 a 220 kDa) que constituye los peplómeros de forma de “corona”. Algunos virus, incluido el coronavirus humano OC43 (HCoV-OC43), contienen una tercera glucoproteína (HE; 65 kDa) que causa

hemaglutinación y tiene una actividad de acetilesterasa (Riza, 2020). Existen cuatro clases de coronavirus que se designan como alfa, beta gama y delta; la clase de coronavirus beta incluye al virus del Síndrome Respiratorio Agudo Grave (SARS), el virus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) y SARS-CoV-2 que genera COVID-19. Tienen similitudes ya que atacan el sistema respiratorio bajo y generan neumonía, sin embargo, SARS-CoV-2 tiene una mayor tasa de transmisión/contagio y puede afectar al sistema gastrointestinal, corazón, hígado y sistema nervioso central llevando a la falla múltiple de órganos (Su, 2016; Tang, 2020).

### 3.3 SARS-Cov-2

El virus SARS-CoV-2, causante de COVID-19, como ya se mencionó anteriormente se encuentra taxonómicamente en la familia Coronaviridae, la cual se subdivide en cuatro géneros: Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus y Deltacoronavirus. Muchos coronavirus de los cuatro géneros mencionados son causantes de enfermedades en animales domésticos, y por lo tanto son de interés veterinario. Los coronavirus de importancia médica conocidos hasta hoy son siete, y pertenecen a uno de los dos primeros géneros mencionados (Diaz, 2020). Desde el punto de vista eco epidemiológico se pueden clasificar en dos grupos: coronavirus adquiridos en la comunidad (o coronavirus humanos, HCoV) y coronavirus zoonótico como lo muestra la **tabla 1**.

**Tabla 1.** Clasificación de los coronavirus de importancia en la salud humana (Adaptado de: Diaz, 2020)

<b>Adquiridos en la comunidad (asociados con enfermedad respiratoria leve)</b>
HCoV 229E
HCoV OC43
HCoV NL63
HCov HKU-1
<b>Zoonóticos (asociados con enfermedad respiratoria grave)</b>
SARS-CoV. Coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS)

MERS-CoV. Coronavirus del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS)
SARS-CoV-2. Coronavirus de COVID-19
CoV. Coronavirus; HCoV: coronavirus humano

La infección por SARS-CoV-2 se ha clasificado de tres etapas dependiendo del grado de severidad, la etapa inicial o asintomática es cuando ocurre en el establecimiento temprano de la enfermedad, lo que implica un período de incubación asociado con síntomas leves, durante este período, el SARS-CoV-2 se multiplica utilizando el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como entrada a las células, estos receptores están abundantemente presentes en el epitelio humano del pulmón y el intestino delgado, así como en el endotelio vascular. En la segunda etapa o periodo sintomático no severo, la enfermedad pulmonar es establecida, la multiplicación viral y la inflamación localizada en el pulmón es la norma. Finalmente, una minoría de pacientes con COVID-19 pasará a la tercera y más grave etapa de la enfermedad, que se manifiesta como un síndrome de hiperinflamación sistémica extrapulmonar, en esta etapa, marcadores proinflamatorios están elevados incentivando la hiperactividad de la respuesta inmune conllevando hasta a una “tormenta de citocinas” (Wei-Jie, 2020; Siddiqi, 2020; Huang, 2020).

### **3.2 ¿Qué es el COVID-19?**

A partir del 11 de febrero del 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) denominó a la enfermedad infecciosa generada por el virus SARS-CoV-2 como COVID-19 (por sus siglas en inglés, Coronavirus disease 2019), la cual se originó en la Ciudad de Wuhan China, es caracterizada por una neumonía con etiología desconocida; para el 30 de enero el Director General de la OMS declaró que el brote es una pandemia al convertirse en una emergencia de salud pública de importancia internacional (ESPII) ya que para esos momentos había más de 1,991,562 casos confirmados y 130,885 defunciones, siendo los países más afectados China, España Italia y EUA, llevando a sus sistemas de salud al colapso al ser rebasados por el números de casos presentados (PAHO, 2020) En México, los primeros casos confirmados se informaron el 28 de febrero de 2020, un caso ubicado en la Ciudad de México y el otro en el Estado de Sinaloa, sin embargo al día 26 de Julio del

2020 la Secretaría de Prevención y Promoción de la Salud en su comunicado técnico informa que se han confirmado 390,516 casos y 43,680 defunciones (SS, 2020; Martínez, 2020). La enfermedad se transmite de persona a persona a través de las micro gotas procedentes de la nariz o la boca que salen despedidas cuando una persona infectada tose o exhala. Estas micro gotas caen sobre los objetos y superficies que rodean a la persona, de modo que otras personas pueden contraer la COVID-19 si tocan estos objetos o superficies y luego se tocan los ojos, la nariz o la boca. También pueden contagiarse si inhalan las micro gotas que haya esparcido una persona con COVID-19 al toser o exhalar (OMS, 2020; Riza, 2020) El periodo de incubación va de los 4 a los 15 días y los síntomas más comunes a la infección por COVID-19 son fiebre, disnea, tos seca y cansancio. Algunos pacientes pueden presentar dolores, congestión nasal, rinorrea, dolor de garganta o diarrea. Estos síntomas suelen ser leves y aparecen de forma gradual; algunas personas se infectan, pero no desarrollan ningún síntoma y no se encuentran mal. La mayoría de las personas (alrededor del 80%) se recupera de la enfermedad sin necesidad de realizar ningún tratamiento especial. Alrededor de 1 de cada 6 personas que contraen la COVID-19 desarrolla una enfermedad grave y tiene dificultad para respirar. Las personas mayores y las que padecen afecciones médicas subyacentes, como hipertensión arterial, problemas cardíacos o diabetes, tienen más probabilidades de desarrollar una enfermedad grave con un desenlace fatal (~2%). Además, el número básico de reproducción o tasa de infección ( $R_0$  = el promedio de casos secundarios producidos a partir un caso) calculado mediante modelización a partir de datos preliminares disponibles se ha estimado entre 2-3; en el brote de Wuhan el  $R_0$  fue de 2-2.5 (WHO, 2020).

### **3.4 Respuesta inmunológica a la infección de Covid-19**

Se ha observado que los pacientes infectados con COVID-19 tienen altos niveles de IL1b, IFN $\gamma$ , IP10 y MCP1, lo que probablemente conduce a respuestas de células Th1. Además, los pacientes que requirieron ingreso en la UCI presentan niveles más altos de GCSF, IP10, MCP1, MIP1A y TNF- $\alpha$  que aquellos que no requirieron ingreso en la UCI, lo que sugiere que la tormenta de citocinas está asociada con la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, pareciera que la infección por COVID-19 promueve una mayor secreción de



citocinas tipo Th2, que pudiesen suprimir la inflamación, lo que podría diferir la infección por SARS-CoV-2 (Huang, 2020).

Los estudios han demostrado que los casos graves de COVID-19, que presentaban síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), tenían niveles más altos de citocinas inflamatorias. La observación clínica de altos niveles de citoquinas proinflamatorias, que a menudo es causada por enfermedades infecciosas como COVID-19, se describe como síndrome de liberación de citoquinas (SRC) (Honjo et al., 2019). La CRS es una reacción aguda del sistema inmunitario que resulta de la activación de los linfocitos T y un aumento del nivel de citocinas que se liberan de las células mieloides, como los macrófagos y los monocitos, debido a su activación por el coronavirus. Los altos grados de CRS pueden provocar síntomas graves en casos graves.

La interleucina (IL)-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- $\alpha$* ) son las tres citocinas principales que se encuentran en la activación del CRS (Yazdanpanah et al., 2020)

Las muertes por COVID-19 se atribuyen principalmente al daño alveolar difuso con edema pulmonar, formación de membrana hialina e infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial asociado con el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA) en etapa temprana. La prevención del SDRA y la muerte en pacientes con COVID-19 es una emergencia sanitaria urgente. Debido al papel significativo de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  en la activación de CRS, se plantea la hipótesis de que, al bloquear estas vías de citoquinas, se podría disminuir la activación de CRS y sus manifestaciones extremas que conducen a la muerte del paciente (Zhang et al.; 2020).

Según varios estudios, la proteína de unión al receptor (RBP) del SARS-CoV2 se une a la enzima convertasa de angiotensina 2 (ACE2) como su principal receptor para ingresar a varias células (Golshani et al., 2020). ACE2 se expresa principalmente en células cardíacas y alveolares, pero también se puede encontrar en varios tipos de células hematopoyéticas, incluidos macrófagos y monocitos (Zhang et al.; 2020). La infección de células hematopoyéticas con SARS-CoV2 puede provocar la activación celular y la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL 1 y *TNF- $\alpha$*  en la circulación sanguínea sistémica, lo que puede provocar manifestaciones graves de la enfermedad. Por ejemplo, el aumento de la permeabilidad vascular causado por estas citocinas proinflamatorias puede conducir a

la infiltración de células sanguíneas y plasma en los alvéolos, lo que puede provocar síntomas respiratorios como disnea o SDRA en estos pacientes (Zhang et al.; 2020).

Ahora bien, al ser una enfermedad multifactorial es más que evidente que el fondo genético juega un papel crucial debido a que posee una gran influencia en la regulación de la respuesta inmune, así como la frecuencia de estos marcadores, está altamente asociada a la etnicidad. Aunado a lo anterior, existen algunos polimorfismos de nucleótido simple (SNPs por sus siglas en inglés, single polymorphisms nucleotide) en genes que codifican para diferentes citocinas asociadas a la respuesta inmune y que influyen su actividad durante el desarrollo de la patogénesis de la infección, estas variantes genéticas se han analizado en diversas infecciones en las cuales se demuestra su influencia en la regulación biológica de estas moléculas. Además, esto ocurre ya pueden modificar la transcripción y producción de estas citocinas contribuyendo a incrementar la actividad de estas, así como modificar el microambiente coadyuvando a la severidad de las enfermedades (Checa, 2007).

### **3.6 Citocinas**

**Citocinas** Uno de los mayores desafíos durante la respuesta inmune que se presenta por la infección de SARS-CoV-2 es la liberación aberrante de múltiples citocinas, las cuales parecen desencadenar una tormenta de citocinas que produce daño inmunopatogénico en tejidos y órganos, incluso mientras la respuesta inmune busca suprimir y erradicar el virus. El desarrollo de la tormenta de citocinas es caracterizada por la rápida proliferación e hiperactivación de células T, macrófagos, células asesinas naturales (NK's por sus siglas en inglés, natural killers) y la sobreproducción citocinas proinflamatorias y quimiocinas. En las infecciones virales, la liberación aberrante de factores proinflamatorios conduce a la apoptosis de las células epiteliales y endoteliales del pulmón que daña la barrera celular microvascular y epitelial alveolar del pulmón, lo que conduce a una fuga vascular, edema alveolar e hipoxia. La producción exacerbada de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  y GM-CSF, y quimiocinas como CCL2, CCL-5, IP-10 y CCL3, junto con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés reactive oxygen species) causan Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (ARDS, por sus siglas en inglés acute respiratory distress syndrome) que conduce a fibrosis pulmonar y muerte (Osterholm, 2005;

Teijaro, 2004; Reghunathan, 2005; Xinjuan, 2020). Se ha observado que los pacientes infectados con COVID-19 tienen altos niveles de IL1b, IFN $\gamma$ , IP10 y MCP1, lo que probablemente conduce a respuestas de células Th1. Además, los pacientes que requirieron ingreso en la UCI presentan niveles más altos de GCSF, IP10, MCP1, MIP1A y TNF $\alpha$  que aquellos que no requirieron ingreso en la UCI, lo que sugiere que la tormenta de citocinas está asociada con la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, pareciera que la infección por COVID-19 promueve una mayor secreción de citocinas tipo Th2, que pudiesen suprimir la inflamación, lo que podría diferir la infección por SARS-CoV-2 (Huang, 2020).

Aunado a lo anterior, existen algunos SNPs (tabla 2) en genes que codifican para diferentes citocinas asociadas a la respuesta inmune y que influyen su actividad durante el desarrollo de la patogénesis de la infección, estas variantes genéticas se han analizado en diversas infecciones en las cuales se demuestra su influencia en la regulación biológica de estas moléculas. Además, esto ocurre ya que estos SNPs pueden modificar la transcripción y producción de estas citocinas contribuyendo a incrementar la actividad de estas, así como modificar el microambiente coadyuvando a la severidad de las enfermedades.

**Tabla 2.** Polimorfismos en genes de citocinas asociados a la actividad o producción

Citocina	Gen	Chr	Polimorfismos	Efecto biológico	Referencia
IL-1b	IL-1	2q12	-511 T/C(rs16944) +3953T/C en el exón 5 (rs1143634)	Producción de IL-1b y con el desarrollo de desórdenes inflamatorios crónicos	<i>Copeland, 1991; Tarlow, 1993; Santtila, 1998; Witkin, 2002; Mark, 2000; Shen, 2007; Cañas, 2009</i>
IL-1Ra	IL-1RN	2q14	VNTR de 86 pb en el intrón 2 del gen IL-1RN (rs2234663)	In vitro el alelo IL-1RN*2 está asociado al incremento de la producción de IL-1 $\beta$	
IL-6	IL-6	7p21	-634 C/G (rs1800796)  -174G/C (rs1800795)	Alelo C aumentar la actividad del promotor en respuesta a las citocinas IL-1b y TNF-a - Genotipos de -174: GG, GC, CC afectan la transcripción; los haplotipos que contienen el alelo C disminuyen los niveles de expresión de IL-6 y	<i>Hirano, 1998; Yasukawa, 1987; Brull, 2001; Ferrari, 2003 Fishman, 1998; Terry, 2000</i>

				se ha asociado con menores niveles de IL-6 circulante - Alelo G del SNP -174 con una mayor transcripción del gen y mayor producción de IL-6	
IL-8	IL-8	4q13-q21	251 A/T (rs4073) +781 C/T (rs2227306)	Alelo -251A está asociado con niveles elevados de IL-8 e infiltración severa de neutrófilos que a su vez secretan TNF-a, IFN-g e IL-1b	<i>Mukaida, 1989;</i> <i>Taguchi, 2005</i>
IL-10	IL-10	1q31-32	-1082 G/A (rs1800896) -819 C/T (rs1800871) -592 C/A (rs1800872)	Genotipos -1082 G/G, -819 C/C y -592 C/C están asociados con mayor producción de IL-10	<i>Eskdale, 1997;</i> <i>Turner, 1997;</i> <i>Opdal, 2004</i>
TNF-a	TNF-a	6p21	-238 G/A (rs361525) -308 G/A (rs3091256) -1031 T/C (rs1799964)	Alelo A en el SNP -308 es raro (TNF2), pertenece al haplotipo HLA-A1-B8-DR3-DQ2 y se asocia con mayor producción de TNF-a - Producción de TNF-a se ha visto afectada por el SNP -1031 T/C	<i>D'Alfonso &amp; Richiardi, 1994;</i> <i>Wilson, 1997; Lee, 2002</i>
TGF-b	TGF-b	TGF-b	-509 C/T (rs1800469)	Alelo T y el genotipo TT están asociados con una mayor producción de TGF-b, por lo que está asociado con una inhibición del desarrollo de Th1 y Th2, y la respuesta proinflamatoria de Th1	<i>Bayat, 2002;</i> <i>Sugiura, 2002;</i> <i>Bijlsma, 2002;</i> <i>Hsieh, 2005</i>

Debido a lo anterior y a que no se han realizado estudios en la población mexicana mestiza, es necesario comprender cómo influyen las variantes genéticas en la modulación del microambiente de las citocinas sobre la respuesta inmune involucrada en el desarrollo y/o progresión entre estadios durante la patogénesis de la infección por SARS-CoV-2.

#### 4. Planteamiento del problema

Actualmente la infección por SARS-Cov-2 se ha convertido en una emergencia de salud mundial, debido a la velocidad de infección por COVID-19 en las poblaciones, se han hecho algunos estudios sobre los marcadores genéticos que podrían estar asociados al pronóstico y desenlace de la enfermedad. Lo anterior aunado a una serie de manifestaciones

clínicas asociadas como la liberación de citocinas sistémicas, proteínas de fase aguda, factores de coagulación, entre otras, hasta el momento se conoce poco acerca de la relación podrían guardar con el fondo genético y la respuesta inmune ante la presencia del virus SARS-CoV-2 (Lee, 2020).

Diversos estudios han demostrado que los casos graves de COVID-19, que presentaban síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), tenían niveles más altos de citocinas inflamatorias. La observación clínica de altos niveles de citocinas proinflamatorias; se describe como síndrome de liberación de citocinas (SRC) la cual es una reacción aguda del sistema inmunitario (Saghazadeh et al., 2020). Entre ellas, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), el cual promueve la activación del SRC y en niveles elevados puede provocar síntomas graves.

Debido a lo anterior, se ha descrito sobre la influencia del microambiente proinflamatorio en la resolución o severidad de SARS-Cov-2, por lo que analizar los polimorfismos en el gen que codifica para TNF- $\alpha$  (rs361525, rs1800629), contribuye a conocer cuales pacientes podrían desarrollar un estado de la enfermedad más grave, debido al papel crucial en la regulación de la producción de citocinas dentro de la respuesta que desencadena esta patología.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Identificar los polimorfismos en el gen de *TNF- $\alpha$*  (rs361525, rs1800629), asociados al desarrollo y/o severidad de la infección por SARS-CoV-2 en pacientes mestizos mexicanos

### **5.2 Objetivos específicos**

1. Identificar las frecuencias genotípicas y alélicas en el gen de *TNF- $\alpha$*  (rs361525, rs1800629).
2. Determinar la asociación del marcador genético antes mencionado con los datos clínicos de los pacientes con infección por SARS-CoV-2 en pacientes mexicanos.

## **6. Metodología**

### **6.1. Diseño y tipo de estudio**

Transversal comparativo

### **6.2. Criterios de inclusión**

a) Pacientes: Pacientes mayores de edad con diagnóstico por infección de SARS-CoV-2 positivos confirmado por diagnóstico clínico y/o prueba de PCR-RT, que acepten participar en el estudio previo a la explicación verbal y firma de un consentimiento informado

b) Grupo control clínicamente sano: personas sanas tomados de banco de sangre en el archivo histórico de C.M.C 20 de noviembre, debido al control clínico bajo los cuales se seleccionan los donadores a los cuales se les invitará a participar y firmen el consentimiento previa explicación de su participación en el protocolo.

### **6.3. Criterios de Exclusión**

Cuando además de la enfermedad de interés para el estudio, el paciente presente las siguientes condiciones:

a) Quienes no tengan diagnóstico contundente.

b) Pacientes con otro tipo de infecciones virales

### **6.4. Criterios de eliminación**

a) Quienes no tengan diagnóstico contundente.

b) Personas que no cuenten con los datos completos para el análisis

c) Aquellos cuya muestra de sangre, por motivos toma de muestra o inherentes a ésta, no pueda procesarse adecuadamente.

d) Los que en cualquier momento del curso de la investigación declinen su consentimiento informado.

### **6.5. Muestreo no probabilístico**

El reclutamiento será por conveniencia por cuestiones de logística y el número de pacientes que se atiendan en este C.M.N “20 de noviembre”

### **6.6. Materiales y métodos**

Para realizar la presente investigación se utilizó en todo momento el equipo de protección personal pertinente a las áreas de trabajo, así como durante el manejo y procesamiento de muestras. Asimismo, cada uno de los procedimientos se realizó tanto en las muestras de pacientes y en los controles clínicamente sanos (CCS), que acepten participar en el estudio previo explicación verbal y a la firma del consentimiento informado.

#### **6.7. Procedimiento para la toma de muestra sanguínea**

Se realizó asepsia de la región con torundas alcoholadas, se aplicará un torniquete con ligadura de látex en el tercio distal del brazo seleccionado, se puncionó con aguja Vacutainer (BD Biosciences, NJ, USA) 0.8 x 38 en la vena mediana preferentemente, se extrajo dos tubos de 5mL de sangre por presión negativa en un tubo con anticoagulante (heparina).

#### **6.8. Extracción de DNAg**

La sangre con anticoagulante fue procesada para extraer el DNA genómico (gDNA) para la formación del acervo; se determinó la concentración de gDNA a partir de 1  $\mu$ L de cada muestra y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (longitud de onda para ácidos nucleicos) y 280 nm (longitud de onda para proteínas) en el espectrofotómetro IMPLIN P360. La relación gDNA/proteínas ( $A_{260}/A_{280}$ ), debe ser de 1.8 a 2.0, para determinar que efectivamente no existía contaminación excesiva por proteínas. Finalmente, se prepararon diluciones de gDNA a una concentración final de 40 ng/ $\mu$ L en un volumen final de 200  $\mu$ L, las cuales se almacenarán a -20 °C hasta su uso.

#### **6.9. Determinación de marcadores moleculares**

Se extrajo el DNAg de leucocitos totales de muestras de sangre periférica de pacientes con COVID-19 y controles, recolectado en tubos de 4 mL con ácido EDTA, utilizando la técnica modificada de Miller (Miller *et al.*, 1988). A partir del DNAg extraído, se realizó la genotipificación de los polimorfismos en el gen de *TNF- $\alpha$*  (rs361525, rs1800629) se llevó a cabo mediante de la técnica de PCR en tiempo real, utilizando las sondas TaqMan (Pre-Designed SNP Genotyping Assays, Life Technologies, Applied Biosystems, California, USA). La amplificación se realizó en el equipo PCR en tiempo real Applied Biosystems QuantStudio 3 (Life technologies Applied Biosystems, California, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor.

## 6.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se capturaron en una hoja de cálculo en el programa Microsoft Excel y se analizaron con el programa estadístico SPSS v.24. Para las variables continuas los resultados se presentarán en promedios y desviación estándar cuando las variables se distribuyan de forma normal, como frecuencia y en porcentajes cuando sean categóricas. En todos los casos se tomará como significancia estadística una  $p < 0.05$

## 7. Aspectos éticos

- De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, los procedimientos relacionados con este protocolo se consideran de riesgo mínimo, de acuerdo con lo indicado en Título Segundo -De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo I, Artículo 17, Numeral II, que a la letra dice: “Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes físicos... extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud, con frecuencia máxima de dos veces a la semana y volumen máximo de 450 ml en dos meses...”, y en cumplimiento de los Artículos del 18 al 23; así como lo establecido en el Título Sexto -De la Ejecución de la Investigación en las Instituciones de Atención a la Salud-, Capítulo Único, abarcando del Artículo 113 al 120.
- Se sometió a revisión en el Comité de Ética, Bioseguridad e Investigación del CMN “20 de noviembre” para su aprobación.
- Los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado previo a la inclusión del estudio, en donde se les explico el propósito, los beneficios y riesgos que podrían presentarse en el curso de la investigación, así como también se les informó de sus derechos y responsabilidades al momento de estar incluidos.
- La decisión de participar en el estudio es responsabilidad solamente de los individuos participantes, así como de retirarse del estudio cuando así lo deseen, su decisión no afectará de ningún modo la atención que reciben en el CMN “20 de Noviembre”. Los datos recabados se mantendrán de manera confidencial, solo el personal autorizado



de la Coordinación de Investigación del CMN “20 de Noviembre” podrá tener acceso a la información. En la recolección de datos personales se siguen todos los principios que marca la Ley Federal de Protección de Datos: licitud, calidad, consentimiento, información, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad. Se han implementado las medidas de seguridad, técnicas, administrativas y físicas necesarias para proteger los datos personales y evitar daño, pérdida, alteración, acceso o tratamiento no autorizado. Toda la información proporcionada se utilizó con fines de investigación y conforme a los consentimientos informados y el aviso de privacidad.

- Los investigadores confirmamos que la revisión de los antecedentes científicos del proyecto justifican su realización, que contamos con la capacidad para llevarlo a buen término, nos comprometemos a mantener un estándar científico elevado que permita obtener información útil para la sociedad, a salvaguardar la confidencialidad de los datos personales de los participantes en el estudio, pondremos el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación por encima de cualquier otro objetivo, y nos conduciremos de acuerdo a los estándares éticos aceptados nacional e internacionalmente según lo establecido por la Ley General de Salud, Las Pautas Éticas Internacionales Para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de la Organización Mundial de la Salud, así como la Declaración de Helsinki.
- Las muestras solo fueron utilizadas exclusivamente para este proyecto de investigación y en caso de sobrar muestra se procederá a la eliminación del mismo, conforme a lo estipulado por la normatividad vigente (NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002).

## **8. Consideraciones de bioseguridad**

- Los investigadores involucrados utilizaron en todo momento el equipo de protección personal pertinente a las áreas de trabajo, así como durante el manejo y procesamiento de muestras.
- La toma de muestras durante el estudio se realizó en apego al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, respetando aspectos de

tomar las medidas pertinentes para evitar cualquier riesgo o daño a los sujetos de investigación.

- Las muestras biológicas fueron adquiridas por personal experto y adecuadamente identificadas, contenidas y almacenadas durante un periodo máximo de 2 años. Su análisis y determinaciones se realizaron de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.
- Posteriormente, los desechos de muestras de sangre y sus elementos fueron eliminados en un contenedor hermético de color rojo. El material que ha estado en contacto con los residuos biológicos (como tubos, puntas, gasas, torundas, sanitas, etcétera) fueron desechados en bolsas rojas; el material punzocortante se desechó en contenedores rojos, rígidos de polipropileno. Lo anterior en cumplimiento con lo establecido en las disposiciones de la fracción 6 de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 de Residuos Biológico-Infeciosos.

## 9. Resultados

### Datos demográficos

En este estudio se han captado un total de 40 muestras de sangre periférica hasta el día 28 de agosto del presente año, teniendo 34 muestras de pacientes con COVID-19 y 6 muestras de controles, de las cuales el 50% de las muestras corresponden al género femenino y el otro 50% al género masculino, con un promedio de edad 39 años y una mediana de 32 años.

Debido a la captación lenta de muestras, se tomaron 60 controles de archivo histórico las cuales fueron captadas dentro de C.M.N 20 de noviembre.

Con los datos obtenidos de los pacientes se concluyó que el 79.41% residen de Ciudad de México, un 17.64% del estado de México y con un 2.94% de Nayarit.

En el caso de los controles obtenidos en el archivo histórico del C.M.N 20 de noviembre se obtuvo que un 54.54% residen en Sinaloa, el 33.33% de Morelia, 9.09% de la Ciudad de México y con un 3.03% de Guerrero como se muestra en la **tabla 3**.

**Tabla 3. Características demográficas**

<u>Variable</u>	<u>Pacientes n=34</u>	<u>Variable</u>	<u>Controles n=66</u>
<b>Edad promedio(años)</b>	39	<b>Edad promedio(años)</b>	76
<b>Sexo n (%)</b>		<b>Sexo n (%)</b>	
Mujer	14 (41.17)	Mujer	37 (56.06)
Hombre	20 (58.82)	Hombre	29 (43.93)
<b>Lugar de origen n (%)</b>		<b>Lugar de origen n (%)</b>	
Ciudad de México	27 (79.41)	Ciudad de México	6 (9.09)
Estado de México	16 (17.64)	Morelia	22 (33.33)
Nayarit	1 (2.94)	Sinaloa	36 (54.54)
		Guerrero	2 (3.03)

A partir de la extracción de DNAG se realizó la tipificación de las cuarenta muestras para los polimorfismos en el gen de *TNF-α* (rs361525, rs1800629), en los cuales se obtuvo que los datos de la asociación entre genotipos y COVID-19 sugieren que el genotipo GA+AA del polimorfismo *TNF-α* -238 se encuentra con una frecuencia del 11.8% en pacientes con COVID-19, mientras que es del 6.1% en controles sanos. Esto se traduce en un OR (odds ratio) de 2.0 con un intervalo de confianza del 95% de 0.48-8.83.

Otro dato es la importancia clínica, aunque el OR para el genotipo GA+AA en *TNF-α* -238 es mayor que 1, el valor de p es 0.4, lo que sugiere que no hay una asociación significativa entre este genotipo y COVID-19 como se muestra en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Frecuencias alélicas y genéticas de polimorfismos en el gen *TNF-a* en pacientes con Covid-19 y controles sanos.

	<b>Covid-19</b> n(%)	<b>Controles</b> n(%)	<b>OR (CI<sub>95%</sub>)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>Genotipo</b>				
<b><i>TNF-α</i> -238</b>	<b>N=34</b>	<b>N=66</b>		
GG	30 (88.2)	62 (93.9)	--	--
GA	4 (11.8)	4 (6.1)	2.0 (0.48-8.83)	0.4

AA	0 (0)	0(0)	2.1 (0.12-34.8)	0.54
GA+AA	4 (11.8)	4 (11.8)	8.26 (0.88-77.20)	0.04
<b>TNF-<math>\alpha</math> -308</b>	<b>N=34</b>	<b>N=66</b>		
GG	29 (85.3)	57 (86.4)	--	--
GA	5 (11.7)	8 (12.1)	1.22 (0.36-4.09)	0.76
AA	0 (0)	1 (1.5)	2.03(0.12-33.76)	1.0
GA+AA	5 (11.7)	9 (13.6)	1.09 (0.33-3.55)	1.0
<b>Alelos</b>				
<b>TNF-<math>\alpha</math> -238</b>	<b>N=68</b>	<b>N=132</b>		
G	64 (94.1)	128 (97)	--	--
A	4 (5.9)	3 (3)	2.66(0.57-12.27)	0.23
<b>TNF-<math>\alpha</math> -308</b>	<b>N=68</b>	<b>N=132</b>		
G	63 (92.7)	122 (92.4)	--	--
A	5 (7.3)	10 (7.6)	0.96 (0.31-2.95)	1.0

Los valores se presentan como frecuencia en porcentaje y número de genotipo o alelos. La comparación de frecuencias entre grupos se analizó mediante la prueba de *Chi-Square*. La significación estadística fue de  $p < 0.05$  Yates; OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza.

## 10. Discusión

Los marcadores genéticos y la respuesta inmune en la infección por SARS-CoV-2 es un tema de gran interés y relevancia en la actualidad. La información que se obtuvo a lo largo de esta investigación sugiere que los marcadores genéticos, en particular los polimorfismos en el gen que codifica para el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- $\alpha$* ), podrían desempeñar un papel importante en la gravedad y el pronóstico de COVID-19.

Los polimorfismos genéticos, como los antes mencionados (rs361525 y rs1800629), son variantes genéticas que pueden influir en la manera en que el cuerpo responde a las infecciones virales. Sin embargo, es importante destacar que la genética es solo uno de los muchos factores que influyen en la gravedad de COVID-19. La edad, el estado de salud general, las comorbilidades y otros factores ambientales también desempeñan un papel importante en el pronóstico de la enfermedad.

En general, este estudio proporciona información valiosa, pero es importante considerar sus limitaciones y cómo los resultados pueden ser interpretados y aplicados en el contexto de la investigación sobre COVID-19

En el presente estudio, el 41.17 % de los pacientes fueron mujeres y el 58.82% fueron hombres. Sí bien, las diferencias de género y edad no fueron estadísticamente significativas, es importante considerar este factor con un mayor número de muestras.

El promedio de edad de los participantes es de 39 años, esto influye de manera directa en los resultados, ya que la gravedad y los síntomas de COVID-19 pueden variar, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud el riesgo de presentar complicaciones graves a causa del COVID-19 es arriba de los 65 años por lo que el promedio obtenido no está dentro del rango.

En cuanto al lugar de origen la mayoría de los pacientes (79.41%) residen de la Ciudad de México, estos reportes no permiten suponer sí diferencias regionales de nacimiento de los pacientes pueden ser factor de riesgo asociado a la infección de COVID-19 sin embargo los controles obtenidos en el archivo histórico del C.M.N 20 de noviembre se obtuvo que el porcentaje más alto (54.54%) residen en Sinaloa lo cual hace esta zona más vulnerable.

En cuando a los resultados mostrados en la tabla 4, nos muestra las frecuencias alélicas y genéticas de polimorfismos en el gen TNF- $\alpha$  en pacientes con COVID-19 y controles sanos, junto con los resultados de las pruebas estadísticas. Este tipo de estudio genético es importante para comprender si ciertas variantes genéticas pueden estar asociadas con un mayor riesgo de desarrollar COVID-19 o una forma más grave de la enfermedad.

## **11. Conclusión**

El análisis de la distribución de genotipos y alelos del gen TNF- $\alpha$  en los grupos de pacientes con Covid-19 y controles revela que no existen diferencias significativas entre ambos grupos. Tanto para el genotipo -238 como para el genotipo -308, las frecuencias de los genotipos GG, GA, y AA, así como la combinación de genotipos GA+AA, no muestran variaciones estadísticamente significativas entre los dos conjuntos de población.

En cuanto a los alelos, la frecuencia del alelo G es predominante en ambos grupos, mientras que la frecuencia del alelo A es más baja. Sin embargo, la comparación de frecuencias no indica diferencias significativas entre los grupos, ya que los valores de p para ambas variantes del gen TNF- $\alpha$  son mayores que 0.05.

En conclusión, según los resultados obtenidos con la prueba de Chi-Square, no hay evidencia estadística que respalde la asociación entre las variantes genéticas del TNF- $\alpha$  y la susceptibilidad a la infección por Covid-19 en la población estudiada. Es importante tener en cuenta que estos resultados se basan en el conjunto de datos proporcionado y la interpretación podría cambiar con datos adicionales o en estudios más amplios.

## 12. Referencias bibliográficas

- Atzeni, F. & Sarzi-Puttini, P. (2013). Tumor Necrosis Factor. Brenner's Encyclopedia of Genetics, 229-231. En el URL: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374984-0.01594-1>
- Bobadilla, Braulio, Ruedlinger, Jenny, Saavedra, Nicolás, Potthoff, Marcelo, Lanás, Fernando, Salazar, Luis, & Pérez, Luis. (2016). Asociación de polimorfismos del gen factor de necrosis tumoral (TNF) con el desarrollo de reestenosis de stent post angioplastía coronaria. Revista chilena de cardiología, 35(2), 91-98. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-85602016000200001>
- Checa Caratachea MA. (2007). Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. Rev Inst Nal Enf Resp Mex, 213-221.
- Díaz-Castrillón, F. J., & Toro-Montoya, A. I. (2020). SARS-COV-2/COVID-19: El virus, la enfermedad y la pandemia. Medicina y Laboratorio, 24(3), 183-205. <https://doi.org/10.36384/01232576.268>
- Golshani M, Saghazadeh A, Rezaei N. (2020). SARS-CoV-2 – a tough opponent for the immune system. Arch Med Res ; 51(6):589- 92
- Guan W-J, Ni Z-Y, Hu Y, Liang W-J, Ou C-Q, He J-X. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. N Engl J Med. 382:1708-20.
- Honjo O, Kubo T, Sugaya F, (2019). Severe cytokine release syndrome resulting in purpura fulminans despite successful response to nivolumab therapy in a patient with pleomorphic carcinoma of the lung: a case report. J Immunother Cancer; 7(1):97.
- Huang Ch, Wang Y, Li X, (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet,395:497-506.
- Lee C & Koohy H. (2020). In silico identification of vaccine targets for 2019-nCoV. F1000 Res. 9:145
- Martínez SJ, Torres RC & Orozco RE, (2020). "Características, medidas de política pública y riesgos de la pandemia del Covid-19". En el URL: <http://bibliodigitalibd.senado.gob.mx/handle/123456789/4816>

Miller, S.A., Dykes, D.D. & Pulesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16(3): 1215-1219.

Organización Mundial de la Salud, “Orientación”, 2020. En el URL:

<https://www.who.int/es/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public/q-a-coronaviruses>

Osterholm MT. Preparing for the next pandemic. *N.Engl.J.Med.* 2005;352(18):1839-1842.

PAHO (Organización Panamericana de la Salud) (2020). “Actualización Epidemiológica. Nuevo coronavirus (COVID-19)”. En el URL: <https://www.paho.org/sites/default/files/2020-02/2020-feb-28-phe-actualizacion-epi-covid19.pdf>

Reghunathan R. Jayapal M. Hsu LY. (2005) Expression profile of immune response genes in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome, *BMC Immunol.* 6:2

Riza SA, Erdogan A, Mutlu AP. (2020). Novel Coronavirus (COVID-19) Outbreak: A Review of the Current Literature. *EJMO* 4(1):1-7

Saghazadeh A, Rezaei N. (2020). Immune-epidemiological parameters of the novel coronavirus – a perspective. *Expert Rev Clin Immunol*; 16(5):465-70.

Siddiqi HK & Mehra MR. (2020) COVID-19 Iness in Native and Immunosuppressed States: A Clinical Therapeutic Staging Proposal, *Journal of Heart and Lung Transplantation*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.01>

SS (Secretaría de Salud; Secretaría de Prevención y Promoción de la Salud), “Comunicado Técnico Diario”, 2020. En el URL:[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/565712/Comunicado\\_Tecnico\\_Diario\\_COVID-19\\_2020.07.26.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/565712/Comunicado_Tecnico_Diario_COVID-19_2020.07.26.pdf)

Su S. Wong G. Shi W. (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol.* 24(6):490– 502.

Tang N, Li D, Wang X, Sun Z. (2020). Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia.(b);18(4):844-847



Teijaro JR, Walsh KB, Rice S. (2014) Mapping the innate signaling cascade essential for cytokine storm during influenza virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111(10):3799-3804.

Wei-Jie G, Zheng-Yi N, Yu Hu, (2020). Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*; 382:1708-1720

World Health Organization. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019

(COVID-19 2020). En el URL: [https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/who-](https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/who-china-)

[china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf](https://www.who.int/docs/defaultsource/coronaviruse/who-china-joint-mission-on-covid-19-final-report.pdf)

Xinjuan Suna, Tianyuan Wanga Dayong Caib, (2020). Cytokine storm intervention in the early stages of COVID-19 pneumonia. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 53:38-42

Yazdanpanah F, Hamblin MR, Rezaei N. (2020) The immune system and COVID-19: friend or foe? *Life Sci*; 256 : 117900.

Zhang C, Wu Z, Li J-W, Zhao H, Wang G-Q. (2020). The cytokine release syndrome (CRS) of severe COVID-19 and Interleukin-6 receptor (IL-6R) antagonist Tocilizumab may be the key to reduce the mortality. *Int J Antimicrob Agents*; 55 (5):105954